



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
Departamento de Biología Funcional
Facultad de Biología

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN
DE GENES DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EL
ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN FAGÁCEAS**

SALETA RICO SANTOS

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2017







UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA
Departamento de Biología Funcional
Facultad de Biología



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Investigaciones
Agrobiológicas de Galicia

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN FAGÁCEAS



Fdo.:

SALETA RICO SANTOS

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2017

MARÍA CONCEPCIÓN SÁNCHEZ FERNÁNDEZ, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC),

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN FAGÁCEAS”, que presenta **Dña. Saleta Rico Santos**, alumna del Programa de doctorado Ingeniería Biotecnológica, para optar al grado de Doctora en Biología , ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia.

Que considera que representa un trabajo de Tesis Doctoral y autoriza su presentación en la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 27 de Febrero de 2017

Fdo.:

M^a Concepción Sánchez Fernández
(Directora)

IGNACIO ZARRA CAMASELLE, Catedrático del Departamento de Biología Fundamental de la Universidad de Santiago de Compostela,

Como Tutor de la doctoranda **Saleta Rico Santos**, autoriza la presentación de la Memoria titulada “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN FAGÁCEAS”, en el Departamento de Biología Fundamental para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Santiago de Compostela, a 27 de Febrero de 2017.



Fdo.:

Ignacio Zarra Cameselle
(Tutor)



Esta Tesis ha sido financiada por

El ministerio de Ciencia e Innovación, mediante la concesión del proyecto titulado “Análisis funcional del genes de la familia GRAS en el enraizamiento de especies forestales”. Ref. AGL2008-05105-C02-02/FOR.

La Xunta de Galicia mediante la concesión del proyecto titulado “Caracterización de genes de castaño implicados en procesos morfogénéticos de interés para la propagación de arboles seleccionados” Ref. 10MRU400033PR.

La Xunta de Galicia mediante el contrato programa 2014-2016.

Abreviaturas.....	IX
1. Introducción general.....	3
1.1 Fagáceas	4
1.1.1 Roble	7
1.1.2 Castaño	9
1.2 Micropropagación	10
1.2.1 Embriogénesis somática (ES)	10
1.2.2 Inducción de yemas adventicias (caulogénesis u organogénesis)	11
1.2.3 Proliferación vía yemas axilares	11
1.3 Enraizamiento adventicio (EA).....	11
1.4 Embriogénesis.....	14
1.4.1 Embriogénesis zigótica (EZ)	15
1.4.2 Embriogénesis somática (ES)	17
1.4.3 Genes implicados en la embriogénesis	20
1.5 Meristemos	25
1.5.1 Meristemo apical de la raíz (MAR)	25
1.5.2 Meristemo apical del brote (MAB).....	27
1.5.3 Células madre vasculares.....	28
1.6 Raíz.....	29
2. Objetivos.....	35
3. Material y métodos	39
3.1 Material vegetal.....	39
3.1.1 Embriones zigóticos	39
3.1.2 Líneas embriogénicas	39
3.1.2.1 Castaño	39
3.1.2.2 Roble.....	39
3.1.2.3 Alcornoque	39
3.1.3 Brotes <i>in vitro</i>	40
3.1.3.1 Castaño	40
3.1.3.2 Alcornoque	41
3.1.4 Otros materiales.....	41
3.2 Recogida del material.....	43
3.3 Métodos	43
3.3.1 Extracción de ARN total	43
3.3.2 Identificación y clonación de genes en Fagáceas.....	43

3.3.3	Análisis de las secuencias obtenidas.....	49
3.3.4	Análisis filogenético	50
3.3.5	Predicción de la estructura 2D y 3D	51
3.3.6	Análisis de la expresión de los genes de interés	51
3.3.6.1	PCR cuantitativa (qPCR)	51
3.3.6.2	Hibridación <i>In situ</i>	52
4.	<i>Genes AGO (Argonauta)</i>.....	57
4.1	Introducción.....	57
4.1.1	Silenciamiento mediado por ARN	57
4.1.1.1	Mecanismos de acción de los complejos AGO/sARN en plantas	59
4.1.2	Familia de proteínas ARGONAUTA (AGO)	62
4.1.2.1	Estructura de las proteínas AGO.....	63
4.1.2.2	Filogenia de las proteínas AGO vegetales	64
4.1.2.3	Funciones de las proteínas AGO vegetales	65
4.2	Resultados	66
4.2.1	Clonación y análisis de la secuencias <i>CsAGO1</i> , <i>CsAGO4</i> y <i>CsAGO5</i>	66
4.2.2	Análisis filogenético de <i>CsAGO1</i> , <i>CsAGO4</i> y <i>CsAGO5</i>	76
4.2.3	Modelado estructural de las proteínas <i>CsAGO1</i> , <i>CsAGO4</i> y <i>CsAGO5</i>	78
4.3	Discusión	79
5.	<i>Gen CPE (crown preferentially expressed)</i>.....	87
5.1	Introducción.....	87
5.1.1	Proteínas ricas en glicina (GRPs)	87
5.1.2	<i>QrCPE</i> (<i>Q. robur</i> crown preferentially expressed).....	89
5.2	Resultados	90
5.2.1	Identificación y análisis de las diferentes secuencias CPE	90
5.2.2	Análisis filogenético de CPE	92
5.2.3	Análisis de la expresión del gen <i>CPE</i> durante la embriogénesis	98
5.2.3.1	Expresión del gen <i>CPE</i> durante la EZ de castaño	98
5.2.3.2	Expresión de <i>CPE</i> durante la inducción de embriones somáticos.	99
5.2.3.3	Expresión del gen <i>CPE</i> durante el desarrollo de embriones somáticos mediante embriogénesis secundaria.....	100
5.2.3.3.1	Análisis de la expresión del gen CPE en embriones somáticos de castaño mediante qRT-PCR	101
5.2.3.3.2	Análisis de la expresión de CPE durante el desarrollo de embriones somáticos secundarios mediante hibridación in situ	102
5.2.3.3.2.1	Castaño.....	102
5.2.3.3.2.2	Roble.....	104

5.2.3.3.2.3	Alcornoque.....	106
5.2.4	Análisis de la expresión del gen <i>CPE</i> en tejidos postembrionarios mediante hibridación <i>in situ</i>	109
5.2.4.1	Expresión del gen <i>CPE</i> durante el desarrollo de la raíz de roble	109
5.2.4.2	Expresión del gen <i>CPE</i> en brotes y raíces adventicias de castaño	110
5.2.4.3	Expresión del gen <i>CPE</i> en brotes de alcornoque	111
5.3	Discusión	111
6.	<i>Gen SCL1 (Scarecrow-like 1)</i>	121
6.1	Introducción.....	121
6.1.1	Familia gras	121
6.1.2	<i>SCARECROW</i> y genes relacionados.....	124
6.2	Resultados	129
6.2.1	Modelado de la estructura del dominio gras de <i>CsSCL1</i>	129
6.2.2	Análisis de la expresión del gen <i>SCL1</i> durante la embriogénesis.....	133
6.2.2.1	Expresión del gen <i>CsSCL1</i> durante la EZ de castaño	133
6.2.2.2	Expresión de <i>SCL1</i> durante la inducción de embriones somáticos.	135
6.2.2.3	Expresión del gen <i>SCL1</i> durante la embriogénesis secundaria	137
6.2.2.3.1	Castaño	137
6.2.2.3.2	Roble	139
6.2.3	Análisis de la expresión del gen <i>CsSCL1</i> durante la formación de raíces adventicias	141
6.2.4	Análisis de la expresión del gen <i>CsSCL1</i> durante el desarrollo de la raíz.....	144
6.2.5	Análisis de la expresión del gen <i>CsSCL1</i> en el ápice de brotes de castaño	147
6.3	Discusión	148
7.	<i>Gen TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)</i>	157
7.1	Introducción.....	157
7.1.1	TCTP en animales.....	158
7.1.2	TCTP en plantas	159
7.2	Resultados	164
7.2.1	Aislamiento y caracterización de las secuencias de <i>CsTCTP</i> , <i>QsTCTP</i> y <i>QrTCTP</i>	164
7.2.2	Análisis filogenético	168
7.2.3	Modelado estructural	172
7.2.4	Análisis de la expresión del gen <i>TCTP</i> durante la embriogénesis	174
7.2.4.1	Expresión del gen <i>TCTP</i> en embriones zigóticos de castaño	174
7.2.4.2	Expresión del gen <i>TCTP</i> durante la proliferación de embriones somáticos mediante embriogénesis secundaria.....	175
7.2.4.2.1	Análisis de la expresión del gen TCTP en embriones somáticos de castaño y alcornoque mediante qPCR.....	176

7.2.4.2.2	Análisis de la expresión de TCTP durante el desarrollo de embriones somáticos mediante hibridación <i>in situ</i>	177
7.2.4.2.2.1	Castaño.....	177
7.2.4.2.2.2	Alcornoque.....	178
7.2.5	Análisis de la expresión del gen <i>TCTP</i> en tejidos post embrionarios mediante hibridación <i>in situ</i>	180
7.2.5.1	Expresión del gen <i>TCTP</i> en brotes de castaño y alcornoque	180
7.2.5.2	Expresión del gen <i>TCTP</i> en raíces	182
7.3	Discusión	183
8.	Conclusiones.....	191
9.	Bibliografía.....	195



Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico	DIG	Digoxigenina
ABI	Absciscic Acid Insensitive	dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
AGL	AGAMOUS-like	EA	Enraizamiento adventicio
AGO	Argonauta	ES	Embriogénesis somática
AMP	altered meristem program	EZ	Embriogénesis zigótica
Amp	Ampicilina	F	Forward
ARF	Auxin Response Factor	FK	Fackel
ARFs	Auxin response factors	FUS	Fusca
ATML	<i>A. Thaliana</i> meristem layer	GAI	Giberellin-Acid Insensitive
AXR	auxin-resistant	GD	Medio Gresshoff y Doy
BA	6-Benciladenina	GED	Genes expresados diferencialmente
BBM	Baby Boom	GK	Gurke
BCIP	5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato	H	Histona
BDL	Bodenlos	HBT	Hobbit
CAB	cromosomas artificiales bacterianos	HD-ZIP	Leucine zipper
CLF	Curly leaf	HICE	Células hijas de la célula inicial de córtex y endodermis
CLV	Clavata	HSP	Heat Shock Protein
CO	Centro organizador	IC	Células iniciales de la columela
CPE	Crown preferentially expressed	ICE	Célula inicial córtex y endodermis
CQ	Centro quiescente	IEC	Célula inicial caliptra y epidermis
CRE	Cytokinin receptor	ITV	Células iniciales de tejidos vasculares
Ct	Cycle Treshold	Kan	Kanamicina
CUC	Cup-shaped cotyledon		

LB	Luria-bertani	PLT	Plethora
LBD	Lateral organ boundaries domain	PS	Péptido señal
LEC	Cotyledon leafy	qPCR	PCR cuantitativa
LEC	Leafy cotyledon	R	Reverse
LOB	Lateral organ boundaries	RA	Raíz adventicia
MA	Meristemo apical	RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
MAB	Meristemo apical del brote	REV	Revoluta
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	RL	Raíz lateral
MAR	Meristemo apical de la raíz	SCL	Scarecrow-Like
MP	Monopteros	SCR	Scarecrow
MR	Meristemo radicular	SERK	Somatic embryogenesis receptor kinase
MS	Medio Murashige y Skoog	SHR	Short-Root
NTB	4-nitroblue-tetrazolium chloride	STM	Shoot meristemless
PAS	Pasticcino	TCTP	Translationally Controlled tumor Protein
PCR	polymerase chain reaction	Tm	Temperatura de melting
PDF	Protodermal factor	TPL	Topless
PHB	Phabulosa	UPM	Universal Primer Mix
PHD	Finger homeodomain	WOX	Wuschel homeobox
PHV	Phavoluta	WUS	Wuschel
pI	Punto isoelectrico	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
PIN	Pinformed	ZLL	Zwille
PKL	Pickel		
PKL	Pickle (pkl)		









1. Introducción general

Los bosques cumplen multitud de funciones en el planeta, tanto de modo natural como por los usos otorgados por el hombre. Su existencia peligra no solo por su ritmo de explotación debido al incremento de la demanda de madera para las industrias, la deforestación para producción agrícola y la expansión urbanística, sino también por el cambio climático global, la aparición de nuevas enfermedades, el aumento de plagas de insectos y los incendios forestales. Los árboles son importantes para el medio ambiente de la tierra y la vida humana, comprenden aproximadamente el 70-90 % de la biomasa terrestre, lo que afecta, en gran medida, a los ciclos de carbono, agua y oxígeno en la atmósfera (Houghton *et al.*, 2009). Su madera se usa como combustible, como materia prima para las industrias de muebles, construcción, química y papeleras y en bio-refinerías como recurso de carbono renovable (Sannigrahi *et al.*, 2010). Tradicionalmente se han llevado a cabo programas de mejora mediante la selección de ejemplares élite, pero estos programas requieren mucho tiempo, ya que las especies forestales poseen ciclos de vida y tiempos de generación largos. Además, mediante estos programas tradicionales es difícil lograr mejoras significativas de rasgos complejos (Kumar *et al.*, 2015). La biotecnología forestal es el complemento necesario para dichos programas aplicando técnicas de multiplicación vegetativa (micropropagación), uso de marcadores genéticos moleculares y producción de árboles genéticamente modificados para la selección, propagación, conservación y mejora de individuos élite (Umezawa *et al.*, 2008).

La biotecnología forestal se ha beneficiado de los avances en las tecnologías de secuenciación, haciendo posible investigar las bases moleculares del desarrollo de la planta y acceder a marcadores moleculares de caracteres deseables (Neale y Kremer, 2011). Existen varios genomas de plantas secuenciados ([https:// genomevolution.org/ wiki/ index.php/ Sequenced_plant_genomes](https://genomevolution.org/wiki/index.php/Sequenced_plant_genomes)), siendo los de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, los primeros de dicotiledónea y monocotiledónea respectivamente. Desde la publicación de la secuencia de *P. trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006), la primera de árboles y la tercera vegetal obtenida, la rápida evolución de los recursos genómicos y bioinformáticos ha permitido avanzar en el conocimiento de la estructura, la función y la evolución de los genomas forestales (Plomion, Bastien, *et al.*, 2016). Actualmente se han completado o se están llevando a cabo muchos proyectos de secuenciación genómica en distintas especies de árboles forestales como *Eucalyptus camaldulensis* (Hirakawa *et al.*, 2011), *E. grandis* (Myburg *et al.*, 2014), *Picea abies* (Nystedt *et al.*, 2013) *Populus euphratica* (Ma *et al.*, 2013), *P. glauca* (Birol *et al.*, 2013), *Pinus taeda* (Neale *et al.*, 2014; Zimin *et al.*, 2014) o *Betula nana* (Wang *et al.*, 2013), entre otros. También se han decodificado las secuencias genómicas completas de especies frutales como *Vitis vinifera* (Jaillon *et al.*, 2007), *Prunus mume* (Q. Zhang *et al.*, 2012), *P. persica* (Verde *et al.*, 2013),

Pyrus bretschneideri (Wu *et al.*, 2013), *Malus × domestica* (Velasco *et al.*, 2010), *Carica papaya* (Ming *et al.*, 2008) *Theobroma cacao* (Argout *et al.*, 2011) o *Jatropha curcas* (Sato *et al.*, 2011). Además, dentro de la familia de las Fagáceas, recientemente se liberaron las secuencias genómicas de *Castanea mollissima* (<http://www.hardwoodgenomics.org/chinese-chestnutgenome>) y de *Quercus robur* (Plomion *et al.*, 2016), y actualmente se está llevando a cabo la secuenciación completa del genoma de *Q. suber* en el marco del proyecto Genosuber en Portugal.

Los recursos genómicos están disponibles en repositorios, tanto generales como centrados en organismos, familias de proteínas o tipos celulares específicos. Dentro de las bases de datos desarrolladas por y para la comunidad genómica forestal se encuentra por ejemplo “Dendrome Project” (<https://dendrome.ucdavis.edu/>) (Wegrzyn *et al.*, 2008), punto de acceso de TreeGenes (<http://dendrome.ucdavis.edu/treegenes/>) o EVOLTREE (<http://www.evoltree.eu/>). Existen recursos web más específicos como “Fagaceae Genomics Web” (www.fagaceae.org), “Quercus Portal” (<https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal/>), “Hardwood Genomics Project” (<http://hardwoodgenomics.org/>) o “Forest Health Initiative” (<http://foresthealthinitiative.org/>). Estas iniciativas, junto con otros recursos de mapeo, expresión génica, etc han contribuido a incrementar el conocimiento tanto biológico como genético. Entre otras cosas, disponemos de una mayor comprensión del crecimiento y el desarrollo de los árboles, de su respuesta a factores intrínsecos y extrínsecos, de la base molecular de la variación genética y su relación con la variación fenotípica y adaptación (Plomion *et al.*, 2016). Por otra parte, cada vez existen protocolos eficientes de transformación genética en un mayor número de especies, lo que abre la puerta para la obtención de individuos resistentes a enfermedades y estreses climáticos, o con cualidades más productivas (Suzuki y Suzuki, 2014). En Fagáceas están disponibles sistemas transgénicos mediados por *Agrobacterium* en *Castanea sativa* (Corredoira *et al.*, 2004), *Q. robur* (Vidal *et al.*, 2010) y *Q. suber* (Álvarez *et al.*, 2004). El acoplamiento de los recursos genómicos con las tecnologías de micropropagación y transformación genética, acelerará la caracterización génica y permitirá elaborar programas de mejora genética de especies forestales que facilitarán el diseño de árboles para usos concretos: mejora del rendimiento de la biomasa, propiedades de la madera o tolerancia al estrés biótico y abiótico (Plomion *et al.*, 2016). Todo ello permite sentar las bases de las futuras investigaciones para abordar los desafíos emergentes en la silvicultura y con ello preservar, mejorar y usar responsablemente los bosques del mundo (Parent *et al.*, 2015).

1.1 Fagáceas

Las Fagáceas son una familia de elevado interés forestal que incluye especies de gran importancia económica y ecológica. Esta familia comprende a 670 especies de árboles y

arbustos (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/fagalesweb.htm#Fagaceae>) divididas en 2 subfamilias (Fagoideae K. Koch y Quercoideae Ørsted) y 7 géneros (*Castanea*, *Castanopsis*, *Chrysolepis*, *Trigonobalanus*, *Quercus*, *Fagus* y *Lithocarpus*). Las Fagáceas están ampliamente distribuidas por todo el hemisferio norte (Figura 1).

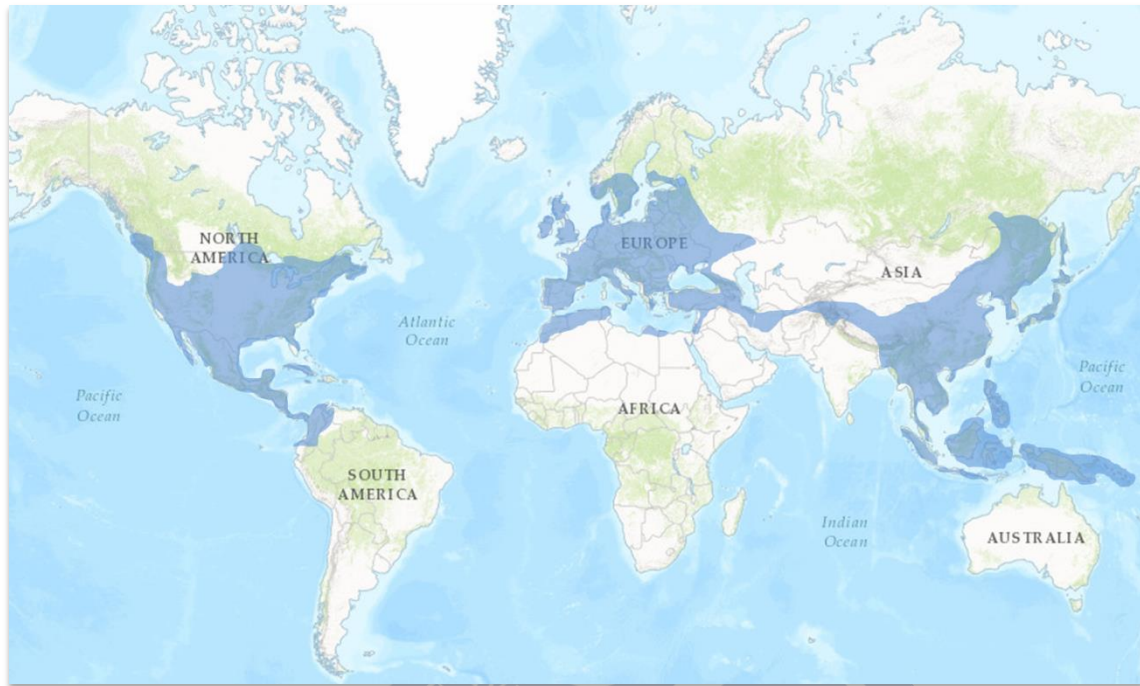


Figura 1.- Distribución generalizada de la familia Fagácea según la web “Angiosperm Phylogeny Website”.

La diversidad a nivel de género está concentrada en el sureste de Asia, donde se cree que evolucionaron la mayor parte de los géneros existentes antes de emigrar a Europa y Norteamérica. Los géneros más abundantes (*Quercus*, *Castanea* y *Fagus*) se distribuyen por América, Asia y Europa y comprenden especies clave de bosques templados septentrionales en estos tres continentes. Estas especies constituyen importantes recursos para un amplio rango de usos (biomasa, fibras, productos de madera y comida). La familia también incluye otros géneros afines como *Castanopsis* y *Lithocarpus* que comprenden cientos de especies en Asia, mientras que las hayas meridionales pertenecen a una familia estrechamente relacionada (*Nothofagaceae*) distribuida en América del Sur y Australasia (Petit *et al.*, 2013). Las floras templadas, subtropicales y semiáridas son particularmente ricas en *Quercus* (415 especies), mientras que los bosques más cálidos del sudeste asiático son diversos en géneros *Lithocarpus* (300 especies) y *Castanopsis* (120 especies). Los patrones biogeográficos combinan géneros más ampliamente distribuidos (*Fagus*, *Castanea*, y *Quercus*) con especies endémicas (*Trigonobalanus sensu lato*, *Chrysolepis*, y *Notholithocarpus*), y hay una clara evidencia de la diversificación *in situ* de los

subgrupos regionalmente distribuidos dentro de los géneros mayores (Axelrod, 1983; Manos y Stanford, 2001; Kremer *et al.*, 2012).

Las especies de Fagáceas tienen un gran valor ecológico, como demuestra el hecho de que la enfermedad del chancro del castaño, causada por un hongo patógeno (*Cryphonectria parasitica*), ha producido el mayor desastre económico en la historia de los Estados Unidos (Wheeler y Sederoff, 2009). Además de su contribución a la economía, son especies clave en los ecosistemas forestales y los principales causantes de la biodiversidad terrestre. En la mayoría de los países son también considerados como un bien patrimonial y cultural. A pesar de su importancia económica, ecológica y cultural, la investigación en genética y genómica en Fagáceas ha recibido menos interés que la investigación en coníferas debido a las limitaciones biológicas como por ejemplo la larga generación y longevidad. Los primeros estudios genómicos en roble se iniciaron hace más de 20 años (Kleinschmit, 1993). A finales de los 80 la genética de poblaciones dominaba la investigación genética en Fagáceas. Se llevaron a cabo extensos estudios usando diferentes marcadores en robles (Kremer y Petit, 1993), haya (Comps *et al.*, 1987) y castaño (Villani *et al.*, 1994) y se controló el flujo génico o hibridación en masas naturales (Bacilieri *et al.*, 1996; Dow y Ashley, 1996). La genómica en las Fagáceas comenzó con el mapeo genético en castaño (Kubisiak *et al.*, 1997), roble (Barreneche *et al.*, 1998) y haya (Scalfi *et al.*, 2004) y más tarde con el mapeo comparativo entre robles y castaños (Barreneche *et al.*, 2004; Casasoli *et al.*, 2006). Posteriormente, se llevó a cabo una amplia investigación en castaño americano y robles europeos (Kremer *et al.*, 2007). Además, los robles también son especies modelo para investigar la delineación genómica de especies, ya que la hibridación ocurre frecuentemente entre especies de las mismas secciones taxonómicas de *Quercus* (Kremer *et al.*, 2010). Estos trabajos sentaron las bases para las investigaciones en genómica a partir de la década de 1990 y facilitó la aplicación de criterios de asignación de rasgos genéticos y cuantitativos. Las tecnologías ómicas se desarrollaron más recientemente y los recursos generados, como secuencias ESTs, SNPs, genes candidatos, clones de ADNc o bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés), son accesibles a través de los depósitos electrónicos y físicos que se han instalado en América del Norte y Europa (revisado por Kremer *et al.*, 2012). En *Castanea* y *Quercus* se construyeron bibliotecas BAC y mapas físicos que proporcionaron los recursos necesarios para los proyectos de secuenciación del genoma completo de *C. mollissima* y *Q. robur* (Plomion *et al.*, 2016) y el proyecto de secuenciación de *Q. suber* que se encuentra en curso.

Muchos miembros de esta familia están sujetos a diferentes estreses bióticos, particularmente enfermedades causadas por hongos. Como por ejemplo *Phytophthora cinnamomi*, un oomiceto que ataca a cientos de especies vegetales a lo largo del mundo incluyendo castaños y robles o *P.*

ramorum que causa una enfermedad que se denomina la muerte repentina del roble (Staton *et al.*, 2015). El rápido cambio climático y la introducción de patógenos han aumentado la necesidad de generar herramientas genéticas para asegurar la conservación y la mejora de los recursos forestales con el fin de satisfacer los futuros desafíos ambientales.

1.1.1 Roble

El género *Quercus* es nativo del hemisferio norte e incluye especies de árboles tanto de hoja caduca como perenne. La clasificación taxonómica de este género es muy complicada, ya que puede estar representado por 200 (Neger y Münch 1950), 320 (Krahl-Urban 1959), o 450 especies (Krüssmann, 1978). Estas diferencias se explican en parte por la definición de híbridos interespecíficos como especies separadas y la subdivisión de formas ecológicas en especies (Kleinschmit, 1993). El género se subdivide en dos subgéneros: *Quercus* y *Cyclobalanopsis* y el primero a su vez se divide en cuatro secciones: *Protobalanus*, *Cerris*, *Quercus* (robles blancos), y *Rubrae* (robles rojos) (Ducousso y Bordaes, 2004). Posteriormente la filogenia molecular identificó dos clados principales en el género *Quercus* (Manos *et al.*, 1999; Bellarosa *et al.*, 2005; Oh y Manos, 2008; Denk *et al.*, 2010). El mayor de los dos clados se ha referido como los robles del Nuevo Mundo con las secciones *Lobatae* (robles rojos y negros), *Protobalanus* (robles copa de oro), y *Quercus s.s.* (robles blancos). El clado más pequeño es estrictamente de Eurasia y unifica dos grupos: los robles *Cerris* (incluyendo las especies del grupo *Ilex*), una radiación de las regiones templadas (por ejemplo, *Q. acutissima*) y semiáridas (por ejemplo, *Q. ilex*, *Q. suber*) (Denk *et al.*, 2010), y el tropical *Cyclobalanopsis* (por ejemplo, *P. myrsinifolia*).

Q. robur pertenece a la sección de robles blancos y junto a *Q. petraea* son las especies más ampliamente distribuidas y las más importantes en Europa, tanto por sus perspectivas económicas como ecológicas. Estos robles, que se extienden de Irlanda a Sicilia y de los montes Urales a Noruega central (Repo *et al.*, 2008) son árboles grandes que alcanzan los 30-40 metros y viven durante 800 años o más. Su madera se usa en la fabricación de muebles y suelos, producción de chapas, y fabricación de barriles (Figura 2).



Figura 2.- Distribución de *Q. robur* en Europa (www.euforgen.org).

Q. suber (alcornoque) es una de las especies de roble más característicos del ecosistema mediterráneo, y desempeña importantes funciones ecológicas, económicas y sociales en zonas del sur de Portugal y España, el norte de Argelia y Marruecos (Knapic *et al.*, 2008), y otros países de la cuenca mediterránea. Portugal aporta más de la mitad de la producción mundial de corcho (Catry *et al.*, 2009). Esta valiosa materia prima se utiliza principalmente para producir tapones de vino (Figura 3).



Figura 3.- Distribucion de *Q. suber* en Europa (www.euforgen.org).

1.1.2 Castaño

El castaño es una especie forestal profundamente arraigada en la cultura popular. En los últimos años se está intentando recuperar y mantener los bosques de castaño que habían caído en el abandono durante el siglo XX (Maynard *et al.*, 2009). El género *Castanea* se divide taxonómicamente en 13 especies que se extienden en tres grandes áreas geográficas del hemisferio norte, siendo la distribución de las especies más importantes la siguiente: en Asia, el castaño está representado por dos especies, *C. crenata* Sieb. y Zucc. y *C. mollissima* B.L., en Europa la especie nativa es *C. sativa* Mill. y en América del Norte *C. dentata* Bork (Vieitez *et al.*, 1986). De modo puntual, algunas de estas especies y variedades seleccionadas se cultivan en ciertos países del hemisferio sur, como Chile y Australia, con la idea de promover la industria de la castaña (Figura 4).



Figura 4.- Distribución de *C. sativa* en Europa (www.euforgen.org).

Es necesario generar un conocimiento más profundo de los aspectos que afectan al crecimiento y mantenimiento de Fagáceas y más concretamente desentrañar los aspectos genéticos y moleculares que controlan su desarrollo, el cual en la actualidad es escaso sobretodo comparado con otras especies forestales. En nuestro laboratorio se lleva años trabajando en la optimización de protocolos de micropropagación de especies forestales, abordando, entre otros, los procesos de embriogénesis somática y enraizamiento adventicio en especies de difícil propagación. La caracterización de las bases genéticas y moleculares que controlan estos procesos de regeneración en Fagáceas, permitirá optimizar el uso de estas especies forestales a nivel comercial.

1.2 Micropropagación

La micropropagación se refiere a la propagación de células más o menos diferenciadas que pueden formar tejidos y órganos para generar en último término plantas completas. Incluye una serie de técnicas de propagación asexual o vegetativa, basadas en las divisiones mitóticas que permiten replicar, de manera teóricamente ilimitada, el genotipo original preservando todas sus características (Monteuuis, 2016). Se basa en el concepto de totipotencia definido por Gottlieb Haberlandt en 1902, término aplicado a la capacidad de una célula vegetal de desdiferenciarse y rediferenciarse para formar órganos, y en última instancia una planta entera (Durzan, 1990). El término micropropagación por tanto se refiere a la multiplicación *in vitro* de explantos en condiciones de asepsia bajo estricto control de luz y temperatura, usando un medio de cultivo específico en el que se añaden reguladores de crecimiento y la descendencia que se obtiene es uniforme (Bonga *et al.*, 2010; Monteuuis, 2016). Existen tres vías principales para llevar a cabo la micropropagación *in vitro*: embriogénesis somática, inducción de yemas adventicias (caulogénesis u organogénesis) y proliferación de yemas axilares. Las dos primeras vías requieren una formación *de novo* de los meristemos, por lo que en el caso de las yemas, debe distinguirse entre la vía de micropropagación *de novo* (por yemas adventicias) y la de yemas axilares, aunque para ciertas especies como eucalipto ambas vías pueden coexistir (Le Roux y Staden, 1991).

1.2.1 Embriogénesis somática (ES)

La embriogénesis somática (ES) es una herramienta biotecnológica que consiste en producir embriones mediante divisiones mitóticas de células somáticas preservando su material genético original, siendo por tanto una técnica de clonación. Los embriones somáticos se originan *de novo*, normalmente después de la formación de un callo inducido artificialmente mediante la aplicación de reguladores de crecimiento que parcialmente son la causa de la variación somaclonal (Jones, 2002; Bairu *et al.*, 2011). En las situaciones más favorables, la embriogénesis puede ser directa, de forma que algunas células pueden evolucionar gradualmente en embriones somáticos, sin pasar por la formación de callo (Yeung, 1995). La ES es la única manera de adquirir el rejuvenecimiento ontogénico completo, ya que se reestablece el programa ontogénico a través de la formación de estructuras embriogénicas. A pesar de la interferencia de genotipo y del medio de cultivo, el rejuvenecimiento fisiológico asociado al rejuvenecimiento ontogénico de la ES ha sido muy útil para la posterior propagación clonal en masa mediante enraizamiento de brotes de genotipos maduros seleccionados (Lelu-Walter *et al.*, 2013).

1.2.2 Inducción de yemas adventicias (caulogénesis u organogénesis)

La micropropagación mediante yemas adventicias depende, de manera similar a la ES, de la formación *de novo* de nuevos meristemas a partir de células especializadas (Bonga y von Aderkas 1992). Estas células, primero se desdiferencian antes de reiniciar el desarrollo del brote a partir de un meristemo apical de nueva formación. Este proceso generalmente se induce mediante la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo de iniciación. Esta capacidad de desdiferenciación se encuentra mayoritariamente en células superficiales de estructuras vegetativas como cotiledones o hipocótilos que caracterizan los estadios tempranos de la ontogenia. Además de la inducción, este proceso requiere dos etapas adicionales: el desarrollo de las yemas y el enraizamiento adventicio (EA). El desarrollo de las raíces adventicias (RA), etapa necesaria para la obtención de una planta autónoma completa, se produce *de novo* posteriormente y no de manera simultánea a la formación del brote. La elongación del brote seguida de la formación de la raíz requiere la transferencia a un medio adecuado.

1.2.3 Proliferación vía yemas axilares

En la proliferación de yemas axilares no es necesaria la inducción de un nuevo meristemo pero, en general si de una segunda etapa de EA, salvo en el caso de especies de fácil enraizamiento. Todas las partes del sistema del brote de un árbol y toda la descendencia producida de manera vegetativa a partir de él, surge de la actividad organogénica del meristemo apical del brote (MAB) inicial formado en el polo apical del embrión. Los meristemas apicales producen a través de divisiones celulares las hojas iniciales que se van a desarrollar en hojas completas y los primordios que formarán los meristemas de nueva formación en la zona axilar de cada hoja que son potenciales MABs. La micropropagación mediante yemas axilares estimula la capacidad organogénica de estos meristemas axilares, que permanecen en reposo bajo la dominancia apical durante largos periodos de tiempo, para que se conviertan en yemas que puedan producir nuevos brotes axilares. Estos brotes pueden subdividirse y ser utilizados en una fase de multiplicación, o bien mediante tratamiento auxínico inducir en ellos la formación de RA con el fin de convertirse en plantas independientes y autótrofas.

1.3 Enraizamiento adventicio (EA)

La formación de RAs es un proceso organogénico post-embriogénico inducido en los brotes micropropagados o en plantas intactas, mediante el cual se inducen raíces *de novo* a partir de células diferentes a aquellas especificadas para desarrollar raíces. Este proceso implica la reprogramación de células diferenciadas y la adquisición de un nuevo programa de desarrollo para formar un meristemo apical radicular (MAR). Las RAs son esenciales para la

supervivencia en numerosas plantas y en colaboración con las raíces laterales (RLs), proporcionan anclaje al sustrato, eficiencia en el uso del agua y extracción de nutrientes del suelo, y almacenaje de reservas. Ambos tipos de raíces son capaces de formar otras RL, lo que contribuye a un mayor desarrollo del sistema radicular. Además, la regulación de la organogénesis de estas raíces supone una manera flexible para que las plantas alteren su forma y distribución de recursos en respuesta a cambios ambientales o después de una lesión. Las raíces formadas en explantos cultivados *in vitro* son generalmente adventicias y su inducción es crucial para el éxito de la micropropagación y para los programas de mejora (Della Rovere *et al.*, 2016).

La formación de RA ocurre de manera natural en algunas especies y también puede ser inducida por estreses o a través la aplicación de auxina mediante un proceso regulado de proliferación celular y diferenciación de nuevas células a raíces (Revisado por Geiss *et al.*, 2009, Oinam *et al.*, 2011). Las auxinas (naturales y análogos sintéticos) se usan habitualmente para estimular la inducción del primordio de la RA, debido a su papel central en este proceso (Gutierrez *et al.*, 2012) y su efecto es dependiente del tipo de auxina, la concentración usada y de la sensibilidad de los tejidos en los que se aplica (Casson y Lindsey, 2003; Pop *et al.*, 2011). Además de factores endógenos como genotipo y estado de maduración, y de la auxina, existen otros factores que modulan la formación de RA, entre ellos la luz, la temperatura y la nutrición mineral son los más importantes (Geiss *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009, da Costa *et al.*, 2013). La luz, el corte y la temperatura afectan a este complejo proceso a través de la interacción con auxinas (Pacurar *et al.*, 2014). El proceso de desarrollo de la RA consiste en tres fases sucesivas pero independientes: 1) inducción (periodo que precede a ningún evento histológico), 2) iniciación (divisiones celulares que conducen a la formación de meristemos radiculares internos, caracterizados por la presencia de pequeñas células con grandes núcleos y citoplasma denso) y 3) fase de expresión (desarrollo de las típicas estructuras, crecimiento interno del primordio de la raíz y emergencia de la raíz) (Pacurar *et al.*, 2014). Las RA de *Arabidopsis* organizan un centro quiescente (CQ) y un nicho de células madre (CM) como las RL y la raíz primaria. El establecimiento y mantenimiento del CQ y el nicho de CM son independientes del origen de las células fundadoras de RA. Se necesita la acción combinada de la auxina y la citoquinina e implica la expresión de genes específicos, que son los mismos que controlan el CQ y la definición de nicho y funcionamiento en el MAR y la punta de RL (Della Rovere *et al.*, 2016).

La capacidad de enraizamiento es dependiente del genotipo, por lo que existen enormes variaciones entre individuos incluso dentro de la misma especie. La maduración es otro factor importante en la capacidad rizogénica de las plantas y afecta también a otras características morfológicas, a la tasa de crecimiento y a otros rasgos fisiológicos y de desarrollo (Greenwood y Hutchison, 1993; Peragine *et al.*, 2004). En especies forestales, la edad del árbol y la

maduración determinan la capacidad para regenerar brotes, raíces o embriones somáticos (Greenwood, 1987). La eficiencia de regeneración es mucho más alta en tejidos en los primeros estadios del desarrollo. La disminución en la capacidad para formar RA a medida que un árbol crece y se desarrolla, es un rasgo de maduración que limita la propagación clonal de árboles elite (Sánchez y Vieitez, 1991). Tejidos maduros y juveniles, incluso de la misma planta, pueden tener diferente respuesta al tratamiento con auxina (Pijut *et al.*, 2011), y por lo tanto una diferente respuesta rizogénica. Los mecanismos detrás de la re-especificación de las células para inducir un MAR, especialmente en relación al estado de maduración no se conocen (Greenwood y Weir, 1995; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999; Díaz-Sala *et al.*, 2002; Abarca y Díaz-Sala, 2009).

Entre los diferentes sistemas experimentales para abordar la formación de RA, el empleo de material del mismo genotipo pero con diferente estado ontogenético y diferente capacidad de enraizamiento en respuesta a la auxina puede ayudar a ahondar en los mecanismos subyacentes en el proceso de diferenciación y formación de un nuevo meristemo de raíz. En nuestro laboratorio disponemos de un sistema de brotes de castaño cultivados *in vitro* establecido a partir de renuevos basales (RB) y ramas de la copa (C) del mismo árbol adulto. El comportamiento de ambos tipos de tejido es totalmente distinto, tanto a nivel de proliferación y crecimiento como en la capacidad de enraizamiento. Los cultivos Rb tienen un comportamiento juvenil, responden mejor a los tratamientos que se le aplican y forman raíces fácilmente, mientras que los cultivos C tienen características adultas y una baja tasa de enraizamiento (Sánchez y Vieitez, 1991).

Las RL surgen del periciclo de la raíz primaria, sin embargo en muchas especies y en el caso de Fagáceas, las células competentes para formar RA se localizan en la región cambial y parénquima vascular. Estas células muestran división rápida y reorientación de planos de división para organizar directamente un MAR en respuesta a auxina exógena. En los brotes C, esas células responden a la presencia de auxina exógena dividiéndose, pero no tiene lugar la reorientación de los planos de división necesarios para la organización directa de un MAR, dando lugar a la formación de callo (Ballester *et al.*, 1999). Por lo tanto, la organización de los meristemas radiculares tras la inducción con auxina parece producirse de manera independiente de la reorganización celular y división, de forma que la capacidad de entrar en el ciclo de división celular no es suficiente para reiniciar el estado celular previo en células no competentes (Abarca *et al.*, 2014). Las células procambiales parecen ser nichos de células madre pluripotentes y totipotentes para la organogénesis y ES (de Almeida *et al.*, 2012). La disminución de la formación de RA relacionada con la maduración podría ser resultado de la supresión de los niveles de expresión génica que son necesarios para que las células adultas entren en la vía de formación de la raíz (Hutchison *et al.*, 1999). Los mecanismos que permiten

que una célula somática diferenciada se desdiferencie y se reprogramme para adquirir un nuevo destino y desarrollar una raíz, brote, embrión o reparar tejidos dañados aún son desconocidos.

Existen varios genes implicados en la señalización de auxinas durante el EA y varios factores de transcripción parecen estar implicados en la iniciación o desarrollo de RA en árboles (Legué *et al.*, 2014). En *A. thaliana* se han identificado algunos genes implicados en la formación de RA en el hipocótilo, por ejemplo: *AUXIN RESPONSE FACTOR 17 (ARF17)* (Sorin *et al.*, 2005), *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16 (LBD16)* y *LBD29*, así como proteínas *GH3-like*. Muchos de los genes implicados en la formación de raíz primaria como por ejemplo *HOBBIT (HBT)*, también podrían estar implicados en formación de RA. Genes implicados en formación de RL como *ARF17* y *ARF19* (revisado por (Guilfoyle y Hagen, 2007)), también juegan un papel importante en formación de RA, al menos a partir de hipocótilos. Sin embargo, no está claro si estos genes también están implicados en la formación de raíces a partir de brotes, donde el origen es diferente (Smolka *et al.*, 2009). Hasta el momento, se han llevado a cabo algunos estudios para abordar el proceso de enraizamiento en especies forestales (Hutchinson *et al.*, 1999; Lindroth *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2003; Goldfarb *et al.*, 2003; Busov *et al.*, 2004) sin embargo todavía están por dilucidar los mecanismos moleculares que tienen lugar en la organización de los meristemos durante la formación de RA. En leñosas se han aislado muy pocos genes con posible implicación en formación de RA. Los genes *5NG4* de *Pinus taeda* L. (Busov *et al.*, 2004), así como los genes *SCARECROW-LIKE* de *P. radiata* y *C. sativa* (*PrSCL-1* y *CsSCL-1*) (Sánchez *et al.*, 2007) y el gen *SHORT-ROOT (PrSHR)* (Solé *et al.*, 2008) de *P. radiata* parecen estar implicados en la formación de RA. En manzano, se identificó el gen *ARRO-1* que parece desempeñar un papel en formación de RA, tras su inducción con auxina (Butler y Gallagher, 2000; Smolka *et al.*, 2009). En nuestro laboratorio, mediante técnicas de “Differential display” e hibridación sustractiva se han aislado diversas secuencias parciales en base a su relación con el EA y la maduración (Sánchez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000; Covelo *et al.*, 2009). La obtención de las secuencias completas, permite profundizar en el posible papel que juegan los respectivos genes.

1.4 Embriogénesis

La embriogénesis es el comienzo del desarrollo de la planta. Independientemente del origen del embrión, en la embriogénesis se establecen los ejes corporales y se producen las primeras CM y los primeros precursores de tejido que sirven como marco posicional para el posterior desarrollo de la planta (Thomas *et al.*, 2002). Los destinos celulares y los patrones que ocurren durante este paso se repiten durante el crecimiento, así el embrión maduro comprende los mismos tipos tisulares básicos de cualquier planta. La mayoría de los estudios en embriogénesis se han centrado en *Arabidopsis*, ya que tiene un patrón de divisiones celulares muy regular y

predecible. A pesar de las diferencias con embriones de otras plantas con divisiones menos ordenadas, las posiciones relativas de los distintos linajes celulares se mantienen y en todos los casos dan lugar a una plántula con meristemos apicales (de raíz y de brote), con uno o dos cotiledones en extremos opuestos y con un patrón radial en capas tisulares concéntricas (Yoshida *et al.*, 2014; ten Hove *et al.*, 2015).

1.4.1 Embriogénesis zigótica (EZ)

La embriogénesis ocurre de manera natural como resultado de una doble fertilización, durante la cual dos unidades espermáticas derivadas del polen se liberan dentro del saco embrionario. Una de ellas se fusiona con el óvulo y da lugar al cigoto, cuyo posterior desarrollo se denomina embriogénesis zigótica (EZ). La otra unidad espermática se fusiona con la célula central y da lugar al endospermo que proporciona nutrientes para el desarrollo del embrión y la posterior germinación. A la vez, el tejido materno (óvulo) también experimenta un crecimiento controlado para proporcionar el espacio necesario para el crecimiento del embrión y el endospermo. El embrión junto con otras células de la planta madre se convierten en la semilla que tras su germinación dará lugar a una nueva planta (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Abid *et al.*, 2010; ten Hove *et al.*, 2015).

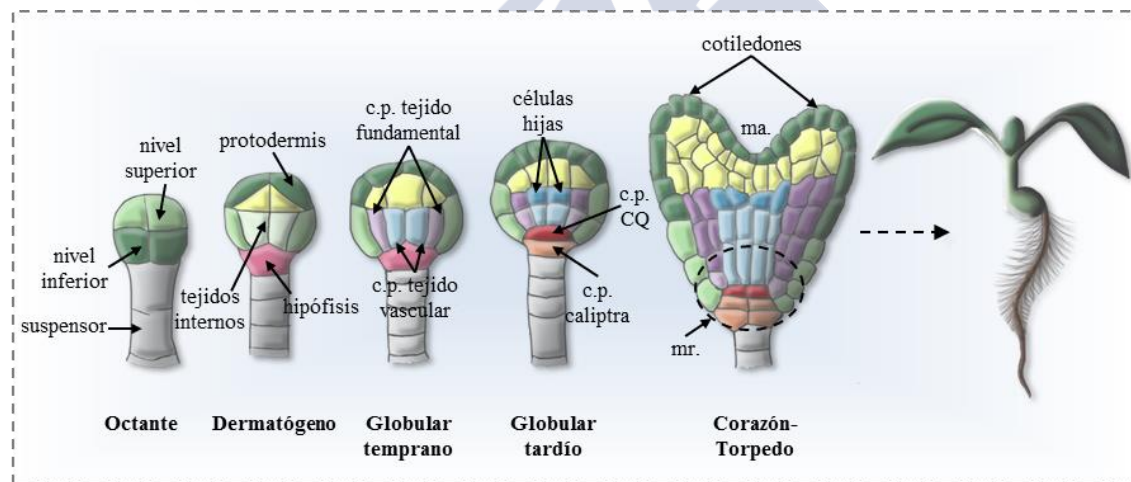


Figura 5.- EZ en *Arabidopsis*. Se muestra el desarrollo embrionario de estadio octante a corazón-torpedo. Las células están coloreadas de acuerdo con su linaje. CQ (centro quiescente); c.p. (célula precursora); ma (meristemo apical); mr (meristemo radicular). Basado en los datos de (Radoeva y Weijers, 2014; Yoshida *et al.*, 2014; ten Hove *et al.*, 2015).

El desarrollo del embrión zigótico puede dividirse en dos etapas: una primera fase morfogenética y una segunda fase metabólica. Durante la fase morfogenética se establece la polaridad del embrión, se diferencian los distintos tipos celulares y se forma el patrón tisular. El embrión se desarrolla a lo largo de dos ejes, 1) el eje apical-basal determinado por el posicionamiento del meristemo apical (MA) y el meristemo radicular (MR), y 2) el eje radial determinado por los distintos tipos tisulares que se organizan en capas concéntricas alrededor

del eje apical-basal. Una vez se han formado todas las estructuras embrionarias, se produce el crecimiento del embrión hasta que se detiene la división celular cuando alcanza su tamaño completo dentro de la semilla llegando a la fase metabólica en la que se acumulan las sustancias de reserva necesarias para la posterior germinación y crecimiento de las plántulas. (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Bentsink y Koornneef, 2008; De Smet *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

En cotiledóneas el desarrollo del embrión zigótico se puede dividir en cuatro estadios sucesivos: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Las primeras etapas del desarrollo del embrión son esencialmente las mismas en prácticamente todas las plantas superiores (Maheshwari y Maheshwari, 1950; West y Harada, 1993). Después de la fertilización, el cigoto se alarga a lo largo del futuro eje apical-basal y se divide asimétricamente, formando dos células hijas diferentes: una célula apical que dará lugar a la mayor parte del proembrión y una célula basal que dará lugar al suspensor extraembrionario que proporciona el soporte mecánico y los nutrientes al embrión en crecimiento. En la célula apical se producen una serie de divisiones que dividen el volumen celular original. Primero se producen dos rondas de divisiones longitudinales para producir cuatro células de igual tamaño y después se produce una división transversal generando el embrión en estadio octante, donde se establecen el nivel superior y el nivel inferior (Figura 5). Posteriormente todas las células del proembrión se dividen tangencialmente, dando lugar a ocho células internas y ocho células externas llegando así a etapa de dermatógeno. Esta división separa la protodermis (precursor de epidermis) de los tejidos internos (precursores del tejido fundamental y vascular). En los siguientes estadios la orientación de las divisiones celulares es muy regular en la mitad inferior del embrión y menos en la mitad superior. En la siguiente etapa globular las células exteriores protodérmicas se dividen anticlinalmente, solo para extender la capa externa y las células internas se dividen longitudinalmente para formar las células precursoras del tejido fundamental (las más externas) y las células precursoras del tejido vascular (las más internas). Posteriormente, las células precursoras del tejido fundamental se dividen longitudinalmente y después transversalmente, mientras que las del tejido vascular lo hacen transversalmente. Por otra parte, la célula superior del suspensor se especifica como la hipófisis, que se convierte en parte del proembrión y se divide simétricamente para formar una célula pequeña lenticular que es el precursor del CQ, y una célula basal más grande que es el precursor de las CM distales del meristemo de la raíz (Figura 5) (Yoshida *et al.*, 2014; ten Hove *et al.*, 2015). Debido al aumento de la proliferación en dos regiones opuestas en la región apical al final de la etapa globular, el embrión llega a una etapa de corazón temprano. En la etapa corazón el embrión ya no es esférico y la disposición celular forma los precursores de los cotiledones, el hipocótilo y los tipos tisulares básicos. La proliferación que tiene lugar en los primordios de los cotiledones y en el eje conduce al estadio embrionario torpedo. Esta etapa está marcada, además de por la especificación de los

cotiledones, por la organización de dos tipos de CM en los extremos opuestos del eje corporal, los meristemas primarios apical y radicular. En el estadio torpedo y la posterior fase cotiledonar se completan los tejidos provasculares y la organización celular del hipocótilo y el polo radicular, además tiene lugar una elongación del embrión a lo largo del eje apical-basal. Una vez que el embrión ha alcanzado el tamaño completo, se sintetizan y almacenan sustancias para la posterior germinación y el crecimiento de las plántulas. Por último, el óvulo que contiene el embrión maduro forma una semilla, que permanece inactiva hasta que condiciones favorables desencadenen la germinación y el crecimiento de la plántula (Zhang y Laux, 2011; Radoeva y Weijers, 2014; Yoshida *et al.*, 2014; ten Hove *et al.*, 2015).

Estos procesos están regulados por numerosos factores, incluyendo fitohormonas, enzimas y otras sustancias relacionadas con la embriogénesis (Mansfield y Briarty, 1991; Bard, 1994; Goldberg *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 2006; Zhang y Laux, 2011; Radoeva y Weijers, 2014; Yoshida *et al.*, 2014; ten Hove *et al.*, 2015). Los reguladores de crecimiento tales como auxina (Galinha *et al.*, 2007), citoquinina (Dello Ioio *et al.*, 2007), etileno (Swarup *et al.*, 2007), jasmonato (Devoto y Turner, 2003), ácido abscísico (Achard *et al.*, 2003), brasinosteroides (Mouchel *et al.*, 2006) y giberelina (Ubeda-Tomas *et al.*, 2008) desempeñan un papel importante en las decisiones de destino celular durante la embriogénesis.

1.4.2 Embriogénesis somática (ES)

La embriogénesis puede ocurrir también sin fertilización, mediante la generación de embriones asexuales que se forman a partir de tejido materno o de un óvulo no fertilizado (Nogler, 1984). La formación de embriones asexuales también se puede lograr *in vitro* mediante embriogénesis gametofítica o mediante embriogénesis somática (ES). La embriogénesis gametofítica es un proceso mediante el cual se pueden generar embriones haploides a partir del gametofito masculino o femenino, mientras que en la ES se inician embriones a partir de células esporofíticas somáticas, es decir, células distintas de los gametos (Bhojwani y Razdan 1996; Raghavan, 2000). Las células somáticas, bajo condiciones de inducción, generan células embriogénicas que atraviesan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la formación de embriones somáticos (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Este proceso se describió por primera vez en zanahoria (*Daucus carota*) (Steward, 1958; Reinert, 1959) y en las últimas dos décadas en muchas otras especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. La ES y EZ representan programas de desarrollo paralelos en los cuales las células adquieren destinos celulares embriogénicos y se desarrollan en embriones maduros. El desarrollo del embrión somático se asemeja mucho al desarrollo del embrión zigótico, tanto fisiológica como morfológicamente aunque se originan a través de una vía diferente (von Arnold *et al.*, 2002).

En general, la ES se puede dividir en dos fases: inducción, en la cual las células somáticas diferenciadas adquieren competencia embriogénica y proliferan, y fase de expresión en la que las células embriogénicas muestran su competencia y se diferencian para formar embriones somáticos (Jimenez, 2001). La ES puede ocurrir de manera natural o *in vitro* después de una inducción experimental (Steward, 1958; Reinert, 1959; de Vries *et al.*, 1988). La ES puede tener lugar de forma directa o indirecta. En la ES directa, los embriones se desarrollan directamente en la superficie del tejido organizado mientras que en la ES indirecta existe un paso intermedio de formación de callo o cultivo de células en suspensión (Namasivayam, 2007; Yang *et al.*, 2010). La inducción puede ocurrir a partir de varios órganos vegetales como hojas, segmentos de tallos, embriones zigóticos o inflorescencias jóvenes, e incluso a partir de células individuales, como protoplastos (Luo y Koop, 1997). Los mecanismos por los cuales se induce la embriogénesis son complejos pero similares entre las diferentes especies vegetales y consta de varios pasos (Elhiti *et al.*, 2010). Primero, las células del explanto tienen que tener el potencial para expresar totipotencia. En segundo lugar, las células deben adquirir la competencia para responder a las señales inductivas exógenas, aunque alternativamente puede inducirse directamente en las células somáticas (Zimmerman, 1993; Dodeman *et al.*, 1997). En tercer lugar, las células competentes deben ser inducidas por estímulos específicos físicos o químicos (como condiciones osmóticas, cambios en el pH, concentraciones de amino ácidos y sales, shock térmico, tratamiento con sustancias químicas o reguladores de crecimiento, en particular auxina) y comprometerse en la vía embriogénica. El compromiso con la embriogénesis requiere un paso de dediferenciación en el que las células diferenciadas del explanto pierden su destino celular específico y se vuelven meristemáticas (Elhiti *et al.*, 2010). Esas células meristemáticas pueden ahora iniciar un nuevo destino de desarrollo y regenerar embriones, dependiendo de las condiciones del cultivo proporcionadas (Elhiti, Stasolla, *et al.*, 2013). Los factores que más afectan al proceso incluyen genotipo, maduración y condiciones fisiológicas/ontogenéticas del material de partida así como el medio de cultivo y las condiciones físicas aplicadas *in vitro* incluyendo el tiempo del tratamiento (Hernández *et al.*, 2011, Corredoira *et al.*, 2012; Corredoira *et al.*, 2015).

Dado que la ES tiene lugar en condiciones *in vitro*, permite controlar la progresión de la embriogénesis y sus múltiples condiciones de cultivo, además de producir en poco tiempo un gran número de embriones de desarrollo sincronizado, por lo que en general, la ausencia de material no es un factor limitante para la experimentación. Esto sumado a la posibilidad de observar el proceso, la capacidad de obtener embriones a partir de diversos tejidos y a la similitud en el desarrollo de los embriones somáticos y zigóticos, ha convertido a la ES en un sistema modelo para estudiar los cambios morfológicos, moleculares, fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la embriogénesis en plantas superiores (Quiroz-Figueroa *et al.*,

2006; Yang y Zhang, 2010). El estudio de los embriones zigóticos está limitado por su localización dentro de la semilla, lo que hace difícil aislarlos, particularmente, durante los primeros pasos de la embriogénesis, momento en el que solo un pequeño número de células está implicado en el desarrollo del embrión. La ES se ha usado para estudiar los eventos reguladores del desarrollo vegetal (Cairney y Pullman, 2007; Quiroz- Figueroa *et al.*, 2006; Zimmerman, 1993). Por otra parte, como ya se dijo en el apartado 1.2.1, la ES es por sí misma una herramienta muy importante en la mejora vegetal y propagación *in vitro* de cultivos (Brown y Thorpe, 1995), tanto por su gran potencial para la producción de un elevado número de plantas, como por su uso en transformación genética (Park y Bonga, 2010). Sin embargo, la inducción de cultivos embriogénicos a partir de otros tejidos que no sean embriones zigóticos en general es difícil y en algunas especies la inducción no es posible en absoluto. La incapacidad de inducir un cultivo embriogénico de ciertas especies, tejido, estado de desarrollo o genotipo se llama recalcitrancia. Un mayor conocimiento de la regulación del desarrollo del embrión en general y del desarrollo del embrión somático en particular, nos puede ayudar a superar las dificultades con la recalcitrancia y conducirnos a mejores métodos de propagación clonal.

En nuestro laboratorio se han establecido varias líneas embriogénicas tanto del género *Castanea* (Corredoira *et al.*, 2016) como del género *Quercus* (Corredoira *et al.*, 2014). A partir de dichas líneas, mantenidas en proliferación mediante embriogénesis secundaria, se pueden aislar embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo, e investigar los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de los mismos. Además, el sistema permite estudiar el proceso de inducción en el explanto inicial, que es una etapa limitante especialmente cuando se lleva a cabo en material adulto. La ES se ha estudiado intensamente en diferentes especies vegetales, como zanahoria, trigo y *Picea* (Fujimura y Komamine, 1979; Ahmed y Sagi, 1993; Bozhkov *et al.*, 2002), abordando la identificación de genes que pueden estar implicados en el proceso (Chugh y Khurana, 2002). Como en cualquier proceso de regeneración *de novo*, la desdiferenciación celular y la adquisición de la competencia embriogénica requieren una reprogramación de la expresión génica para establecer nuevos programas de desarrollo (Feher *et al.*, 2003). Este cambio en el desarrollo implica la activación y represión de genes específicos que confieren a las células somáticas la capacidad de iniciar la vía embriogénica (Chugh y Khurana, 2002). Además, los diferentes estados de desarrollo de los embriones somáticos están asociados con cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con actividad genómica, por lo que la histodiferenciación de los embriones somáticos también está controlada por la expresión temporal de genes específicos. Sin embargo, los mecanismos moleculares de este cambio de destino celular y de la regulación del desarrollo del embrión aún no están claros.

1.4.3 Genes implicados en la embriogénesis

La especificación de las distintas identidades celulares durante la embriogénesis está estrechamente controlada por vías moleculares específicas y suele estar marcada por el comienzo de patrones de expresión específicos. Ya en los primeros estadios de la embriogénesis, se inician programas específicos de transcripción en las células precursoras de los elementos del patrón embriogénico (Haecker *et al.*, 2004). Las dos células resultantes de la división asimétrica que ocurre en el cigoto rápidamente asumen distintos perfiles transcripcionales, expresándose el gen PINFORMED7 (PIN7) en la célula hija basal (Gälweiler *et al.*, 1998; Friml, 2003), y el gen WOX2 específicamente en la célula hija apical (Haecker *et al.*, 2004). La expresión asimétrica de PIN7 y WOX2 es importante para establecer la identidad de la célula apical del embrión en este estadio. Otro gen involucrado en la especificación temprana de los dominios del embrión es el gen GN, afectando a la formación del eje apical-basal (Mayer *et al.*, 1993; Vroemen *et al.*, 1996; Shevell *et al.*, 1994; Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001, 2003). Posteriormente se elaboran programas de expresión específicos de cada región.

En dicotiledóneas, el embrión temprano se divide en tres dominios: apical, central y basal (Laux *et al.*, 2004). El establecimiento del ápice del brote durante la embriogénesis se divide en tres pasos: 1) la especificación del dominio apical mediada por los genes GURKE (GK), PASTICCINO (PAS) y acetil-CoA carboxilasa 1 (ACCase 1), 2) la iniciación del nicho de CM en el que están implicados los genes WUSCHEL (WUS) y SHOOT MERISTEMLESS STM con papeles complementarios en el mantenimiento del MA, y CLAVATA (CLV), cuya función es limitar el tamaño del meristemo. Otros genes necesarios para controlar el destino de las CM del MA en desarrollo son LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP), homeodomain FINGER (PHD-FINGER), ZWILLE (ZLL), ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) y MONOPTEROS (MP) y 3) el establecimiento del patrón central-periférico en el que están implicados los genes CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC) en el dominio central (que regulan tanto la formación del MA como la separación de los cotiledones y órganos florales) y el gen STM en el dominio periférico. Las funciones de los genes CUC requiere de la actividad de MP y PIN1. Los genes LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) y AINTEGUMENTA están implicados en el desarrollo de órganos laterales y las proteínas PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV) y REVOLUTA (REV) mantienen el equilibrio entre indeterminación del MA y la determinación del crecimiento de órganos laterales (Laux *et al.*, 1996; Mayer y Jürgens, 1998; Moussian *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000). La señalización de auxina también ejerce una importante papel en el establecimiento del patrón del dominio apical del embrión (Fujita *et al.*, 2008). Cabe señalar las proteínas TOPLESS (TPL) y TOPLESS-RELATED (TPR), que funcionan junto con proteínas AUX / IAA en la represión transcripcional mediada por auxina de genes promotores de raíz en el dominio apical (Laux *et al.*, 2004; Abid *et al.*, 2010). El dominio central del embrión está

marcado por la actividad de los genes FACKEL (FK), HYDRA1, y STEROL METHYLTRANSFERASE1/CEPHALOPOD (Topping *et al.*, 1997, Diener *et al.*, 2000, Jang *et al.*, 2000, Schrick *et al.*, 2000, 2002). En el desarrollo de la región basal y formación del MR están implicados los genes BODENLOS (BDL), MP, HOBBIT (HBT) y AUXIN-RESISTANT6 (AXR6) (Hardtke and Berleth, 1998; Hamann *et al.*, 2002; Haecker *et al.*, 2004; Willemsen *et al.*, 1998; Hobbie *et al.*, 2000). Por otra parte, la división asimétrica de la hipófisis que dará lugar posteriormente al CQ y a las CM de la columela, está marcada por la expresión de los genes SCARECROW (SCR) y WOXY5 (Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Haecker *et al.*, 2004; Laux *et al.*, 2004). En el establecimiento del patrón radial del embrión están implicados los genes que confieren la identidad celular epidérmica como *A. THALIANA* MERISTEM LAYER1 (ATML1) y PROTODERMAL FACTOR2 (PDF2) (Lu *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 2003), los genes WOODEN LEG (WOL) y CYTOKININ RECEPTOR1 (CRE1) que regulan las divisiones celulares en el primordio vascular (Scheres *et al.*, 1995; Mahonen *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001; Hwang and Sheen, 2001) y los genes SHORT ROOT (SHR) y SCR que están implicados en la división asimétrica del tejido fundamental (Helariutta *et al.*, 2000; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 2001; Laux *et al.*, 2004). Por lo tanto el patrón embriogénico está marcado por el establecimiento temprano y posterior refinamiento de dominios transcripcionales (Laux *et al.*, 2004; Abid *et al.*, 2010; De Smet *et al.*, 2010). En una etapa siguiente como es la maduración de las semillas están involucrados los genes COTYLEDON LEAFY 2 (LEC2), COTYLEDON LEAFY 1 (LEC1), FUSCA3 (FUS3) y el ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) (Santos Mendoza *et al.*, 2005; Casson y Lindsey, 2006). Otros reguladores del desarrollo y/o maduración de la semilla son los genes PICKEL (PKL) y el gen TANMEI (TAN) (Li *et al.*, 2005; Yamagishi *et al.*, 2005; Abid *et al.*, 2010).

Mediante el estudio de mutantes con defectos embrionarios, se identificaron varios genes que pueden ser necesarios para la embriogénesis, y pueden ser reguladores maestros de este proceso (Torres-Ruiz y Jürgen, 1994; Lukowitz *et al.*, 1996; Assaad *et al.*, 2001; Strompen *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2002; Liu y Meinke, 1998; Brukhin *et al.*, 2005; Kandasamy *et al.*, 2005; Uwer *et al.*, 1998; Apuya *et al.*, 2001; Griffith *et al.*, 2007). Por otra parte, también se realizaron diferentes análisis transcriptómicos para estudios de expresión global durante la embriogénesis (Casson *et al.*, 2005; Spencer *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2010; Belmonte *et al.*, 2013) y para asociar genes y familias génicas con etapas y procesos metabólicos durante la embriogénesis (Nodine y Bartel, 2010; Xue *et al.*, 2011; Palovaara *et al.*, 2013). Otros estudios se encaminaron a desvelar el papel de genes regulados por hormonas y/o factores de transcripción en etapas tempranas del desarrollo (Jiao *et al.*, 2009; Takacs *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Itoh *et al.*, 2016; Merino *et al.*, 2016) o genes reguladores de divisiones

asimétricas, especificación de la identidad celular y determinación de los dominios del embrión (ten Hove *et al.*, 2015).

El mismo conjunto de genes parece estar regulando los procesos de EZ y ES, incluyendo aquellos con papeles en metilación, respuestas de estrés, regulación del destino embriogénico, división celular, polaridad y patrón de formación (Jin *et al.*, 2014). Un análisis transcriptómico realizado durante la ES mostró la importancia de los factores de transcripción, ya que más de un 80% experimentaban cambios durante la etapa de inducción (Gliwicka *et al.*, 2013). Un posterior estudio demostró que un 86% de estos factores de transcripción también se expresan durante la EZ (Leljak-Levanić *et al.*, 2015).

Los experimentos de caracterización funcional de genes que se expresan de manera diferencial durante la ES, apuntaron varias categorías funcionales dominantes de proteínas: factores de transcripción, relacionadas con reguladores del crecimiento, relacionadas con el ciclo celular, relacionadas con la pared celular y las implicadas en señalización (Yang y Zhang, 2010). Los análisis de expresión génica durante la ES fueron abordados en diferentes especies herbáceas como zanahoria (Sato *et al.*, 1995), soja (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2013; Zheng y Perry, 2014), alfalfa (Mantiri *et al.*, 2008) y *Arabidopsis* (Su *et al.*, 2009), entre otros. Estos análisis también se realizaron en leñosas, como vid (Gianazza *et al.*, 1992), cacahuete (Rani *et al.*, 2005), coníferas (Caimey y Pullman, 2007) y naranjo (Ge *et al.*, 2012). Fruto de estos análisis, se han aislado genes relacionados con la ES como *SERK* (Schmidt *et al.*, 1997), *LEAFY COTYLEDON (LEC)* (Curaba *et al.*, 2004; Gazzarrini *et al.*, 2004; Gaj *et al.*, 2005), *BABY BOOM (BBM)* (Boutilier *et al.*, 2002), y *WUSCHEL (WUS)* (Zuo *et al.*, 2002). Se han investigado también genes que controlan la embriogénesis temprana incluyendo Auxin Response Factor19 (ARF19), WUS, LEC1, SERK1, PRC1, STM, LEC1, CDKA;1, PRZ1, CLF, GLB1, RGP-1 y Heat Shock Protein 17 (HSP17) (revisado por Elhiti *et al.*, 2013).

Aunque en los últimos años se avanzó considerablemente en el estudio de las bases moleculares de la ES, aún no se conocen los mecanismos que desencadenan el cambio del programa vegetativo a embriogénico (Fehér *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Karami *et al.*, 2009; Elhiti, Stasolla, *et al.*, 2013). Se ha involucrado a determinadas proteínas en la desdiferenciación, como las proteínas peroxidasa, Reverse Glycosylating Protein y Heat Shock Protein 17 (de Almeida *et al.*, 2012) ó los genes KRYPTONITE y Polycomb Repressive Complexes (Grafi *et al.*, 2007; Bratzel *et al.*, 2010) y LBD29 (Liu *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2012). Cabe destacar que los reguladores de crecimiento exógenos (auxinas y citoquininas) juegan un papel integral durante el proceso de desdiferenciación (Elhiti *et al.*, 2013).

Otros estudios se enfocaron a la identificación de genes involucrados en la adquisición y expresión de la totipotencia de las células diferenciadas (Zeng *et al.*, 2007). En este grupo se

incluyen los genes PRC2, como CURLY LEAF (CLF) y SWINGER (SWN) (Chanvivattana *et al.*, 2004), y el gen PICKLE (PKL), que se cree que funciona reprimiendo la totipotencia y actúa mediante remodelación de la cromatina (Aichinger *et al.*, 2009). El gen SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 (SERK1) se expresa durante la formación de las células embriogénicas en cultivo y durante la embriogénesis temprana (Hetcht *et al.*, 2001), y se cree que confiere competencia embriogénica. Otro gen importante que parece estar implicado en la promoción y/o mantenimiento de las CM embriogénicas es el factor de transcripción WUSCHEL (WUS) (Zuo *et al.*, 2002; Elhiti *et al.*, 2010). El hecho de que durante la ES, los perfiles de expresión de LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2) y WUS sean similares, (Elhiti y Stasolla 2011; Elhiti *et al.*, 2012), apunta a que puedan estar implicados en la adquisición de la totipotencia. Los genes LEC son esenciales para la embriogénesis *in vitro* y su sobreexpresión favorece la adquisición de la totipotencia (Karami *et al.*, 2001; Harada, 2009), posiblemente activando la expresión de los genes YUC2 y YUC4 que codifican enzimas de la biosíntesis de auxina (Stone *et al.*, 2008). La sobreexpresión de STM aumenta la expresión de WUS y eleva los niveles de ácido indol-3-acético (AIA) endógena en la zona del explanto donde se desarrollan las células embriogénicas durante la inducción de la ES (Elhiti y Stasolla 2011). Los genes LECs inducen directamente AGAMOUS-like 15 (AGL15) (Zheng *et al.*, 2009) que se expresa preferentemente en embriones tempranos y es un importante regulador para controlar procesos específicos de la semilla en el embrión en desarrollo (Heck *et al.*, 1995). La inducción de AGL15 reprime la síntesis de GA (Zheng *et al.*, 2009), por lo que los genes LEC pueden actuar como señal inductiva a través de la inhibición de la síntesis de GA y la activación de la biosíntesis de auxinas.

Una vez que las células somáticas expresan la totipotencia, se activan muchas cascadas de señalización para promover la división celular y el cambio a células embriogénicas. Dependiendo de sus funciones, los genes que regulan esta etapa de desarrollo pueden dividirse en tres categorías principales: 1) ciclo celular, 2) formación y regulación de meristemas y 3) cascada de transducción de señales. En el primer grupo se encuentran las proteínas cyclin-dependent kinase A (CDKA), (Nowack *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2010), la PROPORZ1 (PRZ1) (Sieberer *et al.*, 2003) y la histona H3-H11 (Kapos *et al.*, 1992). En el grupo 2, se incluyen el gen STM, cuya sobreexpresión estimula la ES y el gen CLV1, un regulador negativo del meristemo, cuya sobreexpresión reprime la habilidad embriogénica, lo que sugiere un papel competitivo de los dos genes *in vitro* (Elhiti *et al.*, 2010). En el proceso de la formación y mantenimiento del meristemo también participan varios genes homeobox como STM (Long *et al.*, 1996; Janosevic y Budimir 2006) y WUS implicado en el establecimiento y mantenimiento del Centro organizador (CO) del meristemo apical (MA) (Mayer *et al.*, 1998). La expresión de WUS está estrechamente regulada por CLV1, que promueve la diferenciación de las células

meristemáticas reprimiendo la expresión de WUS por medio de un modelo de señalización que implica otros miembros CLV (Dodsworth, 2009). Los genes que reprimen los meristemas (como estos genes CLV) reducen la ES, mientras que los genes que promueven los meristemas (como STM y WUS) mejoran la ES (Mordhorst *et al.*, 1998; Elhiti, 2010). Finalmente, dentro de los genes que participan en la cascada de transducción de señales, está la cascada MAPK (mitogen-activated Protein kinase) desencadenada por la interacción entre CLV1, 2 y 3, al igual que la Kinase-associated Protein phosphatase (sKAPP) y la GTPasa Rop (Song *et al.* 2006).

La señalización hormonal está muy implicada en el proceso de embriogénesis. En este sentido se han investigado diferentes genes de respuesta a auxina implicados en la ES como los Aux/IAAs (Eckardt, 2001; Leyser, 2002; Weijers y Jurgens 2005), auxin response factors (ARFs) (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003) y PINs (Liu *et al.*, 1993; Friml, 2003). La mayoría de los genes ARFs y Aux/IAAs son activos durante la EZ (Rademacher *et al.*, 2011) y más de la mitad de ellos parecen también estar implicados durante la ES en *Arabidopsis* (Gliwicka *et al.*, 2013) una vez más destacando la similitud de sus funciones durante la ES y EZ. De hecho, genes que han sido descritos como reguladores de la EZ, tales como AGL15, BBM1, EMK, LEC1, LEC2, STM, WUS, HBK3, RKD4, Polycomb repressive complex (PRC2), azadC, SERK1 o GA2ox6, también son esenciales para la ES (Elhiti *et al.*, 2010; Waki *et al.*, 2011; Heidmann *et al.*, 2011).

Existen varias proteínas extracelulares implicadas en la ES entre las que se encuentran enzimas modificadoras de la pared. Los arabinogalactanos (AGPs) y los lipo-quito-oligosacáridos (LCOs) también juegan un papel importante en la señalización durante la ES y las proteínas de la superfamilia de receptores- tipo quinasa con repeticiones ricas leucina (LRR-RLKs), que incluye SERK, CLV, BRL1, entre otras, desempeñan distintos papeles en el desarrollo de embriones somáticos. Distintos efectores de Ca^{2+} como calmodulinas y proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPKs) también están implicados en el proceso y los factores de transcripción de la familia LEC, (AP2/ERF) y homeodominio (WUS, WOX, STM) son claves. Además la ES está regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, modificaciones post traduccionales de histonas y microARNs (revisado por Smertenko & Bozhkov, 2014).

En especies forestales la mayoría de los estudios de expresión génica durante la ES se han llevado a cabo en sistemas embriogénicos de coníferas (Dong y Dunstan, 1999; Stasolla *et al.*, 2004; Cairney *et al.*, 2006), mientras que los estudios realizados a este nivel en angiospermas son más escasos. De los genes identificados en angiospermas leñosas relacionados con la ES, la mayoría son homólogos de los miembros de las familias génicas SERK and LEC (Schellenbaum *et al.*, 2008; Alemanno *et al.*, 2008). En *Q. robur*, se han aislado varios genes LEA que codifican proteínas abundantes en estadios tardíos de la embriogénesis (Šunderlíková *et al.*, 2009).

1.5 Meristemos

Las CM vegetales se definen por su habilidad de auto-renovación y de generar células hijas que tienen la competencia de diferenciarse en distintos tipos celulares especializados para producir nuevos tejidos. Las CM sufren divisiones asimétricas mediante las cuales una célula hija retiene las características de la CM indiferenciada y la otra adquiere un destino celular específico. Esta división es desencadenada por distintos factores intrínsecos y extrínsecos. Las CM mantienen su estado pluripotente en microambientes especializados que se conocen como nichos de CM, donde las señales locales de un organizador actúan para mantener a las CM adyacentes. Los meristemos son dominios que mantienen a las células indiferenciadas en división y producen un microambiente que protege el nicho de CM actuando así como centro de crecimiento y desarrollo. El número de CM y sus células hijas en división en los meristemos, permanece constante, a pesar de los continuos desplazamientos de células a los nuevos órganos por medio de mecanismos que establecen un equilibrio entre división y diferenciación celular. El meristemo apical del brote (MAB) localizado en los ápices de los brotes principales y laterales y el meristemo apical de la raíz (MAR) localizado en el ápice de la raíz, producen células para la formación de los órganos laterales y para el crecimiento en longitud (Miyashima *et al.*, 2013; Heidstra y Sabatini, 2014).

En *Arabidopsis*, después de la primera división asimétrica del cigoto la intersección de varias señales posicionales impulsa una serie de divisiones celulares que son fundamentales para la posición y la especificidad del nicho de CM de la raíz y el brote durante la embriogénesis. La cascada de señalización de quinasa, factores de transcripción y la auxina se han relacionado con las divisiones asimétricas tempranas. La actividad de los nichos de CM está marcada por factores de transcripción específicos tales como WUS y REVOLUTA (REV) para el brote y los genes PLETHORA (PLT) para el de la raíz. La intersección de varias señales posicionales específicas de brote y raíz impulsa una serie de divisiones celulares formativas a partir de la división asimétrica del cigoto en adelante, que son fundamentales para la posición y la especificidad del nicho de CM de la raíz y el brote durante la embriogénesis (Heidstra y Sabatini, 2014).

1.5.1 Meristemo apical de la raíz (MAR)

En el MAR, las CM son específicas de tejido y sus células hijas se comprometen en destinos celulares específicos dependiendo de su posición, es decir, tienen como cometido generar los tejidos específicos de la raíz en crecimiento: estela (periciclo y tejidos vasculares), tejido fundamental (córtex y endodermis), epidermis, caliptra lateral y columela. En *Arabidopsis* se localizan como una única capa que rodea a las células del CQ que actúa como organizador para

prevenir la diferenciación de las CM (Figura 6). Cada CM adyacente al CQ se divide asimétricamente para autorenovarse y para producir una célula hija que se divide un número de veces en la zona de división (ZD), antes de salir del ciclo celular en la zona de transición (ZT). Posteriormente las células se alargan y adquieren un estatus específico de diferenciación, en las zonas de elongación y de diferenciación (ZE y ZD) (Heidstra y Sabatini, 2014).

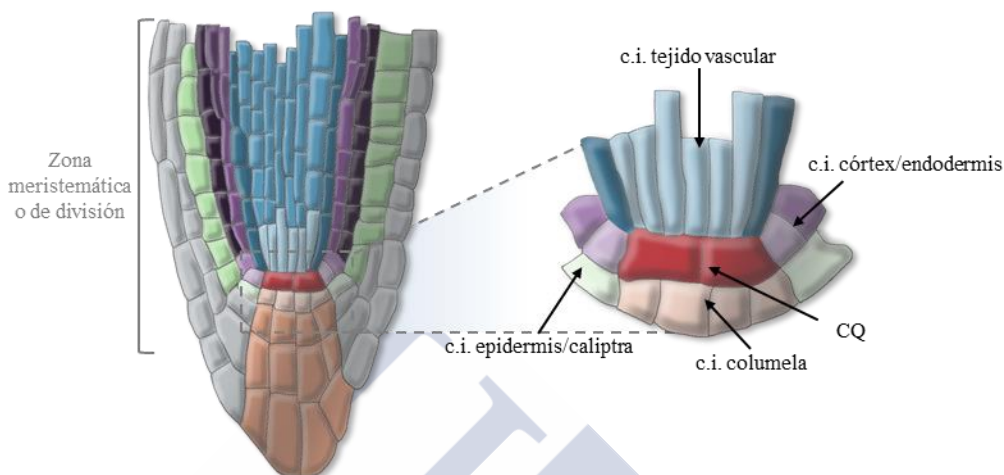


Figura 6.- Nicho de CM de la raíz de *Arabidopsis*. Se muestran las cuatro poblaciones de CM que darán lugar al tejido vascular, al tejido fundamental (córtes y endodermis), a la epidermis y caliptra y a la columela. Estas células iniciales (c.i.) rodean el centro quiescente (CQ).

Para mantener el nicho de CM en la raíz, *WOX5* se expresa en el CQ e inhibe la diferenciación de CM distales. El péptido *CLAVATA3* / *ESR-RELATED 40* (*CLE40*) de las células diferenciadas de la columela transmite señales a través de sus receptores (*ACR4-CLV1*) que se expresan por debajo del CQ para contrarrestar la actividad de *WOX5* y para promover la diferenciación celular. La actividad de *CLE40* es amortiguada mediante el efecto de *CLV1* en la señalización mediada por *ACR4*. El destino de las CM también está restringido por la señalización *AUXIN RESPONSE FACTOR 10* (*ARF10*) -*ARF16*. El gen *SCR* actúa de manera autónoma para la función del CQ y de manera no autónoma para controlar la diferenciación de las células en amplificación (Heidstra y Sabatini, 2014).

En la raíz, la acumulación de auxinas en el CQ actúa como una señal posicional para localizar la expresión de *PLETHORA* (*PLT*) y *BABY BOOM* (*BBM*) (*PLT* / *BBM*). Las proteínas *PLT* / *BBM* se acumulan en el CQ para formar un gradiente instructivo. Paralelamente, *SHORT ROOT* (*SHR*) y *SCR* forman un complejo para especificar la función del CQ y para mantener las CM circundantes. *SHR*, que se expresa en la estela se mueve a las células del alrededor incluyendo el CQ donde activa *SCR*. *SCR* especifica el CQ de manera autónoma pero requiere de la proteína *SHR* para su función (Heidstra y Sabatini, 2014).

1.5.2 Meristemo apical del brote (MAB)

Las CM del ápice se mantienen en función de su posición respecto al centro organizador (CO), el cual envía señales para mantener las CM que están sobre él (Figura 7). El MAB está dividido en tres zonas diferentes: 1) la zona central (ZC) que consta de tres capas de CM diferentes (L1-L3) y del CO que se sitúa debajo de estas, 2) una zona periférica (ZP) de células que se dividen más rápidamente y se diferencian para formar los órganos laterales y 3) una zona rib (ZR), situada por debajo de la ZC y de la ZP, que añade células al tallo en elongación. En la ZC, las CM pluripotentes junto con el CO forman el nicho de CM. Estas CM producen continuamente células hijas por divisiones asimétricas que se dividen mientras atraviesan la ZP antes de diferenciarse y ser reclutadas en el primordio de órganos laterales. Las células de las capas L1 y L2 se dividen anticlinalmente y forman la capa epidérmica y subepidérmica, mientras las células de la capa L3 se dividen en todas direcciones y también se incorporan al tallo en crecimiento para dar lugar a los tejidos internos. La progenie de las CM del brote forma todos los tejidos que sobresalen de la tierra lo que indica su multipotencia (Miyashima *et al.*, 2013; Heidstra y Sabatini, 2014).

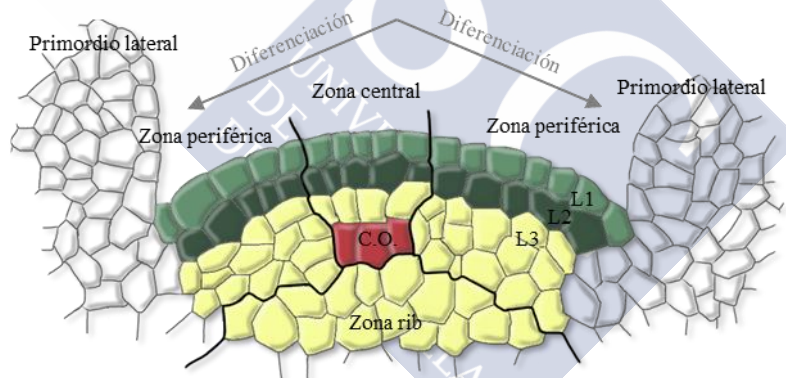


Figura 7.- Meristemo apical del brote (MAB) de *Arabidopsis*. C.O. (centro organizador)

Existen varios genes implicados en el mantenimiento del nicho de CM en el brote. WUS se expresa en el CO y se mueve para inducir la expresión de CLV3 en las CM. A su vez, CLV3 envía señales para reprimir la expresión de WUS. El bucle de retroalimentación WUS-CLV3 está influenciado por la acción de los receptores de la familia ERECTA (ER) para amortiguar los efectos de la señalización WUS, mientras que WUS reprime la expresión del gen receptor y sostiene su propia expresión. WUS también inhibe HEC1 en el CO, que induce la proliferación de CM y WUS reprime los genes de diferenciación-promoción a distancia en el meristemo (Heidstra y Sabatini, 2014).

El posicionamiento del nicho también viene determinado por distintos genes. STM inhibe la actividad de los factores de diferenciación AS1 y GIBBERELLIC ACID (GA) en el meristemo e induce los genes ZWILLE (ZLL) y secuestra microARN 165 (miR165) y miR166 para permitir la expresión de genes CLASS III HOMEODOMAIN-Leu ZIPPER (HD-ZIP III) en el meristemo. Ambos genes STM y HD-ZIP III son necesarios para la actividad de los meristemos y el mantenimiento de las CM. La actividad enzimática de LOG4, que se expresa en la capa 1 (L1), produce citoquinina, que a su vez envía señales a través de sus receptores que se superponen con el CO para activar la expresión de WUS, actuando así como una señal de posición. Los efectos de CK se regulan mediante la inducción de genes inhibidores ARR que generan un bucle de retroalimentación negativa, mientras que WUS inhibe estos genes ARR para reforzar su expresión. La señalización de auxina a través de MONOPTEROS (MP) inhibe la expresión de los genes ARR para excluirlos de la periferia y localizar las CM, a través de la expresión de CLV3 estimulada por ARR, por encima del CO. El MiR394 se desplaza de L1 para inhibir el factor de diferenciación LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR) y para mantener la actividad de las CM dirigida por WUS, proporcionando así información de posición para la competencia de CM (Heidstra y Sabatini, 2014).

1.5.3 Células madre vasculares

Además de las CM del MAB y del MAR, en las plantas vasculares se forman las CM vasculares, denominadas procambium y cambium. Estas CM producen continuamente xilema y floema por medio de divisiones asimétricas periclinales (Eames y MacDaniels, 1947; Esau, 1965). Las gimnospermas y muchas dicotiledóneas experimentan dos fases distintas de crecimiento y desarrollo. El crecimiento primario sucede principalmente en dirección apical, mientras que el crecimiento secundario lo hace en dirección lateral. Durante el crecimiento primario, el xilema y el floema se diferencian a partir de células que se derivan del procambium. Una vez que se establecen los tejidos de la vasculatura primaria, en tallos y raíces se genera el cambium, a partir del procambium y sus células vecinas donde promueve el crecimiento secundario. La proliferación celular en el cambium normalmente es más activa que en el procambium (Eames y MacDaniels, 1947; Esau, 1965). El procambium y el cambium pueden ser consideradas como el mismo conjunto de CM vasculares en los dos estados de desarrollo, ya que sus características básicas y su morfología son muy parecidas (Schuetz *et al.*, 2012; Miyashima *et al.*, 2013). Otros meristemos que contribuyen al crecimiento secundario junto al cambium vascular son el cambium del felógeno (forma felógeno hacia dentro) y el de la corteza (forma corteza hacia fuera). Estos tres tejidos se denominan en conjunto peridermo, que es el tejido exterior que actúa como barrera protectora contra el estrés biótico y abiótico (Evert, 2006). Ya que el crecimiento secundario ocurre especialmente en leñosas, su estudio ha estado enfocado tradicionalmente a árboles. Sin embargo, los estudios de los reguladores moleculares

implicados en el crecimiento secundario han sido llevados a cabo principalmente en *Arabidopsis*, aunque se ha comprobado que los resultados son extrapolables a distintas especies forestales (Barra-Jiménez y Ragni, 2017).

Los tejidos provasculares se establecen más o menos en el estadio globular temprano de la embriogénesis. En *Arabidopsis*, las células internas se dividen en distintas capas, los inicios del tejido fundamental y de las CM vasculares o procambium. En el estadio globular tardío, cuatro células del procambium se dividen periclinalmente, dando lugar al periciclo y a las CM vasculares. Durante este estadio y los estadios corazón y torpedo, el número de filas celulares en el procambium continua aumentando mediante más divisiones periclinales lo que resulta en un patrón vascular radial idéntico al observado en la raíz primaria post-embrionaria. El tejido vascular de la raíz, hipocótilos y cotiledones deriva de la vasculatura embrionaria de la fase globular temprana, mientras que el tejido vascular en todos los órganos y tejidos postembrionarios iniciados de nuevo (hojas, tallo y RLs) se establece *de novo* a partir de los meristemos apicales de raíz y brote. Aunque en el embrión maduro el procambium se extiende de manera continua a lo largo del eje apical-basal sin mostrar ninguna característica de los elementos vasculares diferenciados, se sabe que varios marcadores específicos del tejido vascular se expresan en este estadio lo que indica que el destino celular vascular ya se establece durante la embriogénesis (Miyashima *et al.*, 2013; De Rybel *et al.*, 2014).

1.6 Raíz

La anatomía de la raíz está muy estudiada en *A. thaliana* ya que tiene una estructura regular. Las raíces contienen varias capas concéntricas de células, cada una de las cuales asume un papel específico en la función de la raíz. La anatomía de la raíz madura consiste, desde fuera hacia dentro, en epidermis, córtex, endodermis, periciclo y tejidos vasculares. El tejido fundamental (córtex y endodermis), la epidermis y la estela (sistema vascular incluyendo el periciclo), convergen en las células del CQ que son casi inactivas mitóticamente (CQ). Cada tejido se produce a partir de divisiones celulares de una célula inicial. Las células iniciales se regeneran por división asimétrica y producen células hijas que también se dividen y se diferencian para formar los tejidos de la raíz. Existen cuatro tipos de células iniciales en la raíz de *A. thaliana*, una población de células iniciales produce las células de la columela, otra el tejido vascular, otra la epidermis y caliptra lateral y otra el tejido fundamental. Estas células rodean el CQ (necesario para el mantenimiento de las CM) y se dividen menos frecuentemente que sus células hijas (Pauluzzi *et al.*, 2012). La raíz incrementa su área de superficie creciendo a lo largo mediante la actividad mitótica del MAR y ramificándose mediante la formación de RL (Hao y Cui, 2012).

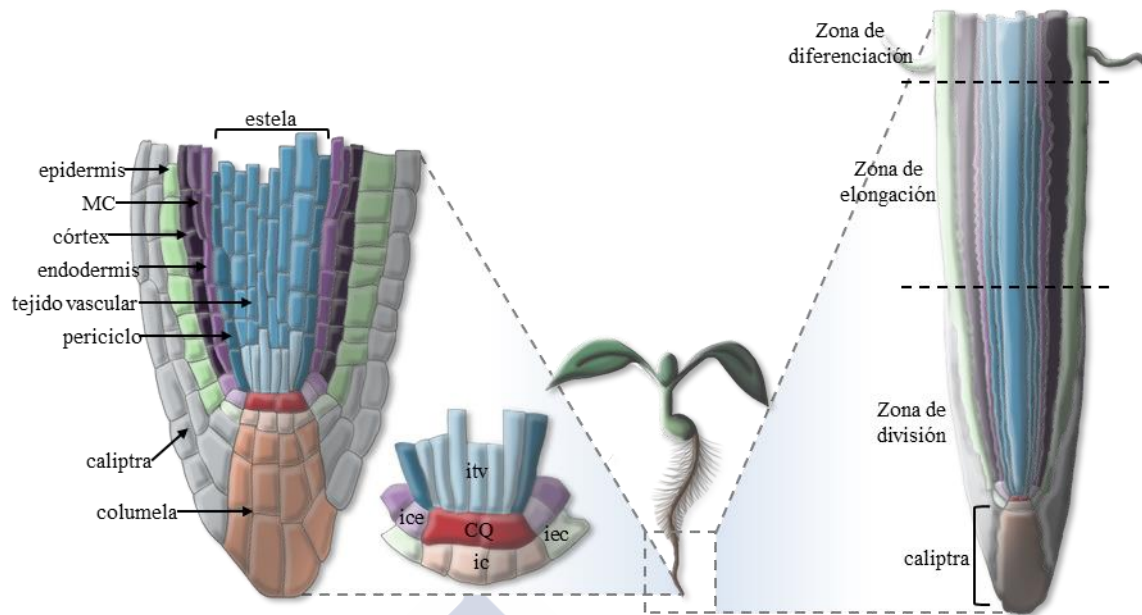


Figura 8.- Meristemo apical de la raíz (MAR) de *Arabidopsis*. CQ (centro quiescente); ic (células iniciales de la columela); ice (célula inicial de córtex y endodermis); iec (célula inicial de epidermis y caliptra); itv (células iniciales del tejido vascular);

Desde la embriogénesis, las CM del tejido fundamental (ICE), experimentan una serie de divisiones asimétricas anticlinales que resultan en la auto-renovación de la ICE y en una célula hija (HICE), que posteriormente se divide periclinalmente para formar las dos capas de tejido fundamental: córtex (fuera) y endodermis (dentro). La endodermis diferenciada contiene las bandas de Caspari en las paredes de las células. A medida que la raíz madura, la endodermis se divide repetidamente de forma periclinal formando múltiples capas de córtex mientras que mantiene una capa única de endodermis. Esto ocurre en casi todas las plantas, menos en *Arabidopsis* donde se forma una única capa adicional de córtex que se sitúa entre la endodermis y el córtex pre-existente y se denomina Middle Córtex (MC). Normalmente las células endodérmicas adyacentes a los polos del xilema son las que tienden a experimentar las divisiones periclinales antes que otras células de la endodermis. La presencia de múltiples capas de córtex generadas por división celular y diferenciación se cree que es una consecuencia de adaptación vegetal. También se sugirió que múltiples capas de córtex pueden proteger de los estreses (Cui y Benfey, 2009; Choi y Lim, 2016; Cui *et al.*, 2016).

En el centro de la raíz está el tejido vascular, que se compone de varios tipos celulares que se organizan en dos dominios separados: floema y xilema. Estos tejidos proporcionan fuerza física al cuerpo de la planta y transportan agua, nutrientes y otras sustancias que se requieren para el crecimiento. Además, conectan todas las partes de la planta, de la punta de la raíz a órganos en el brote (Schuetz *et al.*, 2012; Miyashima *et al.*, 2013). El periciclo es una capa celular única que rodea el tejido vascular y en la mayoría de las especies vegetales es el sitio a partir del que

se forman las RL. El periciclo es un tejido heterogéneo que se divide en dos poblaciones celulares que difieren entre sí, tanto anatómica como funcionalmente. Las que están asociadas a los polos del xilema se denominan XP, tienen citoplasma denso y pueden producir RL. Las que lindan con los polos del floema, denominadas PP, tienen grandes vacuolas que indican un mayor grado de diferenciación y no están implicadas en la formación de RL. La división celular en XP es inducida por auxina y reprimida por citoquininas, mientras que las células PP no se dividen en presencia de auxinas. Las células del periciclo están asociadas íntimamente con el tejido vascular en lugar de ser una capa concéntrica separada (Hao y Cui, 2012; Beeckman y De Smet, 2014). Las células XP, retienen la capacidad de experimentar divisiones asimétricas cuando otras células ya se han diferenciado y requieren un estrecho control de la progresión del ciclo celular para la iniciación de RL, el cual no está sincronizado con el de las células PP. La característica de mantener la competencia de división celular en el periciclo hace que se le considere un meristemo extendido (sus células pueden ser consideradas como verdaderas CM) y es la base para la alta flexibilidad de las raíces para responder a un entorno siempre cambiante en el suelo (Beeckman y De Smet, 2014).

Durante el desarrollo post-embriionario, los tejidos se mantienen y se diferencian para obtener atributos únicos, como desarrollo de pelos radicales y tricomas en el caso de la epidermis (Grierson *et al.*, 2014, Pattanaik *et al.*, 2014), modificación de la pared celular secundaria en el caso del tejido vascular (Furuta *et al.*, 2014) y formación de bandas de Caspari en el caso del tejido fundamental (Geldner, 2013).







2. Objetivos

La propagación vegetativa de individuos seleccionados en muchas especies forestales está limitada por la pérdida de plasticidad y competencia morfogenética del material a medida que avanza el desarrollo vegetativo. La ES y el EA son procesos morfogenéticos de gran interés para la producción clonal de genotipos de interés, siendo uno de los principales cuellos de botella la pérdida de la capacidad regenerativa del material con la edad. Ambos procesos requieren una etapa de desdiferenciación celular y reprogramación genética bien para la adquisición de la competencia embriogénica, o para fijar el destino de células iniciales de raíz en el caso del EA. De momento se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que regulan dichos procesos. El conocimiento de los genes que regulan la adquisición de la competencia embriogénica o de los genes que fijan el destino celular para la iniciación de RA, permitiría entender las bases moleculares que controlan estos procesos.

El objetivo general de esta Tesis es la identificación de genes implicados en procesos morfogenéticos en Fagáceas (*C. sativa*, *Q. robur* y *Q. suber*) y el análisis de su expresión durante el desarrollo del embrión zigótico, durante la inducción y desarrollo de embriones somáticos y durante la formación y desarrollo de RA. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Identificación de genes relacionados con procesos morfogenéticos.
 - 1.1. Aislamiento y caracterización de genes de la familia *Argonauta* (*AGO*). Análisis filogenético.
 - 1.2. Aislamiento y caracterización del gen *CPE* en diversas especies separadas filogenéticamente.
 - 1.3. Aislamiento y caracterización de genes implicados en división meristemática (*TCTP*). Análisis filogenético.
2. Análisis comparativo del patrón de expresión de los genes *CPE*, *SCL1* y *TCTP* en la embriogénesis zigótica y somática de castaño.
3. Análisis de la expresión génica en procesos de regeneración.
 - 3.1. Localización in situ de los transcritos *CPE* y *SCL1* durante la inducción de la ES en roble.
 - 3.2. Localización celular de la expresión de *SCL1* durante la inducción de RA en brotes de castaño con alta y baja capacidad de enraizamiento.
4. Caracterización de la expresión de los genes *CPE*, *SCL1*, *TCTP* durante la embriogénesis secundaria y desarrollo postembrionario.
 - 4.1. Análisis de la expresión durante el desarrollo de los embriones.

- 4.2. Localización de la expresión en diferentes órganos durante el desarrollo postembrionario.







3. Material y métodos

3.1 Material vegetal

3.1.1 Embriones zigóticos

Desde finales de Julio hasta finales de Septiembre, se recolectaron semanalmente (dos recogidas por semana) muestras de semillas inmaduras y maduras de castaño del mismo árbol situado en la finca del IIAG. Durante las primeras semanas se aislaron los óvulos que contenían el embrión en diferentes estados de desarrollo. En las últimas semanas, en las que ya se observaba el embrión en estado cotiledonar avanzado, se aisló únicamente el eje embrionario.

3.1.2 Líneas embriogénicas

3.1.2.1 Castaño

Se utilizaron tres líneas embriogénicas de castaño (HV-Z, CI-3 y CI-9). Las líneas CI-3 y CI-9 fueron establecidas a partir de embriones zigóticos de castaño europeo (*C. sativa* Mill.) (Corredoira y Vieitez, 2006), y la línea HV-Z deriva de embriones zigóticos de un híbrido *C. sativa* x *C. crenata* (Vieitez *et al.*, 1990; Vieitez, 1995).

3.1.2.2 Roble

Se utilizaron dos líneas embriogénicas iniciadas a partir de dos árboles adultos de *Q. robur*, uno situado en Becerreá (línea B17) y otro situado en Rairiz de Veiga que denominamos Sainza (línea SRb-4). La línea B-17 se inició a partir de hojas en expansión de brotes epicórmicos obtenidos por brotación forzada en segmentos de ramas procedentes de la copa del árbol. La línea SRB-4 se inició a partir de hojas aisladas de cultivos de brotes axilares establecidos *in vitro* a partir de renuevos basales del árbol. Las líneas poseen diferente capacidad de proliferación, maduración y germinación (Toribio *et al.*, 2004; Valladares *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008).

3.1.2.3 Alcornoque

Se usó una línea embriogénica (Qs3) establecida a partir de hojas en expansión de los nuevos brotes, obtenidos mediante el forzado de la brotación de ramas de la copa de un árbol adulto de *Q. suber*, siguiendo el protocolo descrito por Toribio (Toribio *et al.*, 2004).

Los cultivos embriogénicos de las líneas embriogénicas de las tres especies, han sido mantenidos por embriogénesis secundaria o repetitiva en medio MS (Murashige y Skoog, 1972) mediante subcultivos de pequeños grupos homogéneos de embriones cada 4-6 semanas. Para la germinación de los embriones somáticos, se transfirieron a un medio de maduración y

posteriormente a un medio de germinación para la obtención de plántulas somáticas de las distintas líneas embriogénicas (Sánchez *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2006). Se aislaron los embriones somáticos en estadio globular, torpedo y cotiledonar a partir de los cultivos en proliferación, así como muestras de ápices de brotes y de raíces obtenidas mediante germinación de los embriones somáticos.

3.1.3 Brotes *in vitro*

3.1.3.1 Castaño

Se emplearon dos líneas de brotes de castaño del mismo genotipo pero con diferente estado ontogenético y diferentes características, entre ellas distinta capacidad de enraizamiento. Este sistema fue establecido a partir de un árbol de más de 80 años (clon P2) y mantenido *in vitro* durante más de 20 años (Sánchez y Vieitez, 1991; Ballester *et al.*, 2009). La línea de brotes P2Rb (RB) fue establecida a partir de los renuevos basales que retienen características juveniles y los brotes poseen alta capacidad de enraizamiento. La línea de brotes P2C (C), establecida a partir de la copa del mismo árbol, mantiene características adultas, y baja o nula capacidad de enraizamiento.

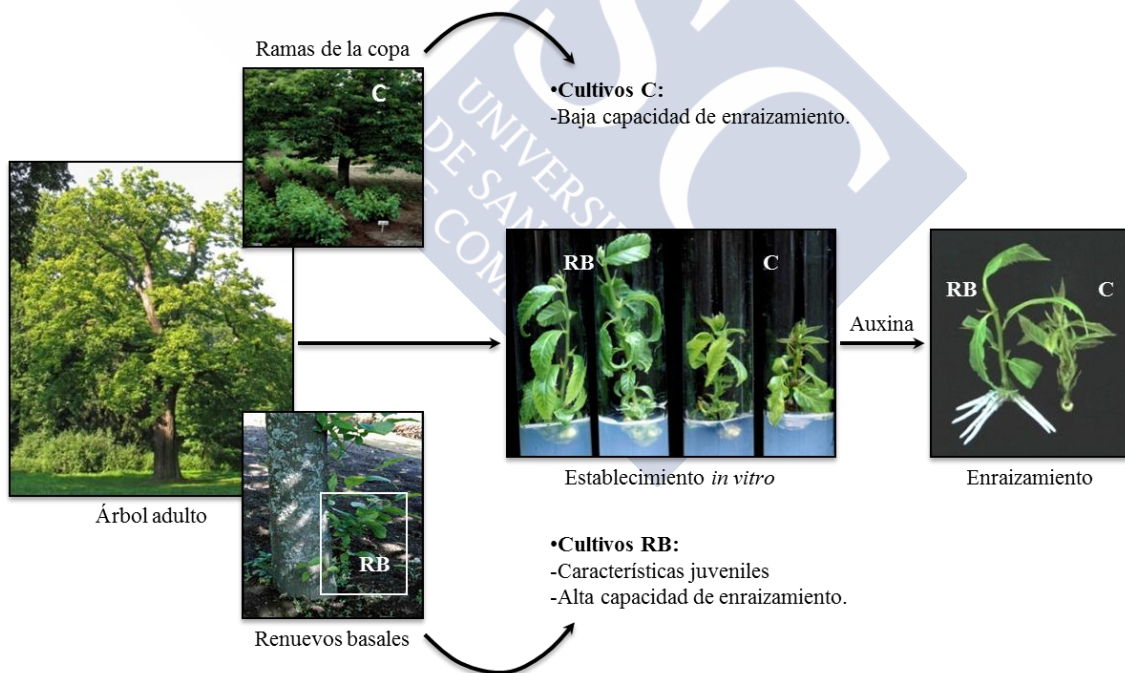


Figura 9.- Representación esquemática de las características del sistema de brotes de *C. sativa*.

Los brotes se mantuvieron en proliferación en medio GD (Gresshoff y Doy, 1972), suplementado con sacarosa (3%), agar Difco (0,8%) y como regulador de crecimiento 0,34 μM de 6-benciladenina (BA). La inducción de RA se realizó según el protocolo descrito por Sánchez y Vieitez (1991). El extremo basal de cada brote se sumergió en una solución hidro-

alcohólica de ácido 3-indolbutírico (AIB) 4,9 mM durante 1 min y posteriormente los brotes se transfirieron a medio GD libre de auxina reduciendo a 1/3 los macronutrientes (GD 1/3). Los brotes sin tratamiento con auxina se usaron como control.

Para los análisis de expresión se recogieron las partes basales (1 cm) de los brotes RB y C después de 12h, 24h, 48 h y 7 días de la inducción de enraizamiento, así como de sus respectivos controles. También se aislaron las partes apicales de los brotes en multiplicación.

3.1.3.2 Alcornoque

Se usaron cultivos de brotes, establecidos a partir del mismo árbol adulto que los embriones somáticos (Qs3), mantenidos en proliferación mediante propagación de yemas axilares. Los brotes se subcultivaron cada 4 semanas en medio MS con nitratos reducidos a la mitad, suplementado con sacarosa 3%, agar Vítro (0,7%) y como regulador de crecimiento 0,44 μ M de BA. Algunos de los brotes (10%) desarrollaron RA de manera espontánea en el medio de proliferación. A partir de estos brotes se aisló la parte apical así como el ápice de la raíz desarrollada.

3.1.4 Otros materiales

Para el aislamiento de la región codificante del gen *CPE* en distintas especies hemos usado plántulas de *Arabidopsis*, embriones somáticos de *Q. suber*, hojas de brotes in vitro de los clones de castaño PO11 y CS12 y material recogido en campo (hojas/acículas/yemas/frondes) de otras 50 especies de diferentes familias, herbáceas y leñosas, incluyendo angiospermas (monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas y pteridofitas (Tabla 1). El material fue inmediatamente congelado en Nitrógeno líquido tras su recolección y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso para la extracción de ARN.

Tabla 1.- Especies usadas para aislar la región codificante del gen *CPE*.

Nombre común	Especie	Orden	Familia	Material	Gen
Alcornoque	<i>Q. suber</i>	Fagales	Fagaceae	Embriones	<i>QsCPE</i>
Roble rojo	<i>Q. rubra</i>	Fagales	Fagaceae	Hojas	<i>QruCPE</i>
Castaño clon Cs12	<i>C. sativa</i>	Fagales	Fagaceae	Hojas	<i>Cs12CPE</i>
Castaño clon PO11	<i>C. sativa</i>	Fagales	Fagaceae	Hojas	<i>PO11CPE</i>
Nogal	<i>Juglans regia</i>	Fagales	Juglandaceae	Yemas	<i>JrCPE</i>
Aliso	<i>Alnus glutinosa</i>	Fagales	Betulaceae	Yemas	<i>AgCPE</i>
Abedul	<i>B. pendula</i>	Fagales	Betulaceae	Hojas	<i>BpCPE</i>
Hiedra	<i>Hedera helix</i>	Apiales	Araliaceae	Hojas	<i>HhCPE</i>
Acebo	<i>Ilex aquifolium</i>	Aquifoliales	Aquifoliaceae	Yemas	<i>IaCPE</i>
Palmera canaria	<i>Phoenix canariensis</i>	Arecales	Arecaceae	Hojas	<i>PcCPE</i>
Col	<i>Brassica oleracea</i>	Brassicales	Brassicaceae	Hojas	<i>BoCPE</i>

Boj	<i>Buxus sempervirens</i>	Buxales	Buxaceae	Hojas	<i>BsCPE</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>A. thaliana</i>	Capparales	Brassicaceae	Plántula	<i>AtCPE</i>
Cornejo	<i>Cornus florida</i>	Cornales	Cornaceae	Hojas	<i>CfCPE</i>
Sáuco negro	<i>Sambucus nigra</i>	Dipsacales	Adoxaceae	Hojas	<i>SnCPE</i>
Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Ericales	Actinidaceae	Yemas	<i>AdCPE</i>
Madroño	<i>Arbutus unedo</i>	Ericales	Ericaceae	Hojas	<i>AuCPE</i>
Rododendro	<i>Rhododendron ponticum</i>	Ericales	Ericaceae	Hojas	<i>RpCPE</i>
Árbol del amor	<i>Cercis siliquastrum</i>	Fabales	Fabaceae	Hojas	<i>CsiCPE</i>
Robinia	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Fabales	Fabaceae	Hojas	<i>RpsCPE</i>
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoales	Ginkgoaceae	Hojas	<i>GbCPE</i>
Olivo	<i>Olea europaea</i>	Lamiales	Olaceae	Hojas	<i>OeCPE</i>
Fresno	<i>Fraxinus excelsior</i>	Lamiales	Oleaceae	Hojas	<i>FeCPE</i>
Magnolia	<i>Magnolia grandiflora</i>	Magnoliales	Magnoliaceae	Hojas	<i>MgCPE</i>
Mimbrera	<i>Salix viminalis</i>	Malpighiales	Salicaceae	Hojas	<i>SvCPE</i>
Tilo	<i>Tilia cordata</i>	Malvales	Tiliaceae	Hojas	<i>TcCPE</i>
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Mirtales	Mirtaceae	Hojas	<i>EgCPE</i>
Araucaria	<i>Araucaria araucana</i>	Pinales	Araucariaceae	Acículas	<i>AaCPE</i>
Enebro	<i>Juniperus communis</i>	Pinales	Cupressaceae	Acículas	<i>JcCPE</i>
Abeto de Douglas	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Pinales	Pinaceae	Acículas	<i>PmCPE</i>
Pino de Monterrey	<i>P. radiata</i>	Pinales	Pinaceae	Acículas	<i>PrCPE</i>
Pino marítimo	<i>P. pinaster</i>	Pinales	Pinaceae	Acículas	<i>PpCPE</i>
Pino salgareño	<i>P. nigra</i>	Pinales	Pinaceae	Acículas	<i>PnCPE</i>
Pino silvestre	<i>P. sylvestris</i>	Pinales	Pinaceae	Acículas	<i>PsCPE</i>
Maíz	<i>Z. mays</i>	Poales	Poaceae	Hojas	<i>ZmCPE</i>
Asplenio	<i>Asplenium nidus</i>	Polypodiales	Aspleniaceae	Fronde	<i>AnCPE</i>
Helecho	<i>Polystichum polyblepharum</i>	Filicales	Polypodiaceae	Fronde	<i>PpoCPE</i>
Culantrillo	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Pteridales	Pteridaceae	Fronde	<i>AcvCPE</i>
Helecho águila	<i>Pteridium aquilinum</i>	Pteridales	Hypolepydaceae	Fronde	<i>PaCPE</i>
Plátano oriental	<i>Platanus orientalis</i>	Proteales	Platanaceae	Hojas	<i>PoCPE</i>
Fresa	<i>Fragaria x ananassa</i>	Rosales	Rosaceae	Hojas	<i>FxaCPE</i>
Manzano	<i>Malus domestica</i>	Rosales	Rosaceae	Hojas	<i>MdCPE</i>
Níspero	<i>Eriobotrya japonica</i>	Rosales	Rosaceae	Hojas	<i>EjCPE</i>
Cerezo	<i>P. avium</i>	Rosales	Rosaceae	Hojas	<i>PavCPE</i>
Castaño de Indias	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Sapindales	Sapindaceae	Hojas	<i>AhCPE</i>
Patata	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanales	Solanaceae	Hojas	<i>StCPE</i>
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanales	Solanaceae	Hojas	<i>NtCPE</i>
Higuera	<i>Ficus carica</i>	Urticales	Moraceae	Hojas	<i>FcCPE</i>
Morera	<i>Morus alba</i>	Urticales	Moraceae	Hojas	<i>MaCPE</i>
Vid	<i>V. vinifera</i>	Vitales	Vitaceae	Hojas	<i>VvCPE</i>
Gramínea	<i>Hordeum geniculatum</i>	Poales	Poaceae	Hojas	<i>HgCPE</i>
Musgo	<i>Sphagnum palustre</i>	Sphagnales	Sphagnaceae	Hojas	<i>SpCPE</i>

3.2 Recogida del material

Todo el material vegetal recogido (embriones zigóticos, embriones somáticos, material post-embrionario *in vitro* y material de campo) fue procesado inmediatamente bien para extracción de ARN, siendo congelado en Nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta el momento de ser usado, o bien para análisis histológicos e hibridación *in situ*, embebido en medio “Jung tissue freezing médium” (Leyca Microsystems Nussloch GMBH, Heildelberg, Germany), en hielo seco y almacenado a -80 °C hasta su uso para realizar los cortes en el criostato.

3.3 Métodos

3.3.1 Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo empleando diferentes kits comerciales, dependiendo del material vegetal. En el caso de los embriones somáticos de las distintas líneas embriogénicas se utilizó el kit RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La contaminación del ARN con ADN genómico fue eliminada con DNaseI en columna durante el proceso de extracción usando On-Column DNase I Digestion set (Sigma-Aldrich). Para la extracción del ARN total de hojas/acículas/yemas/frondes de las especies listadas en la Tabla 1, material más leñoso y con mayor contenido de polifenoles, se usó el kit FavorPrep Plant Total ARN purification Mini Kit (for woody Plant) (Favorgen Biotech corp., Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión del ADN de las muestras de ARN se llevó a cabo con RQ1 RNase-free DNaseI (Promega, Madison, WI) durante 20 minutos a 37 °C, y posteriormente fue purificado mediante extracción fenólica y precipitación con etanol.

La concentración del ARN total obtenido se cuantificó en un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific™, USA) mediante la detección de la absorción a 260 y 280 nm. Para evaluar la pureza del ARN usamos el ratio de los índices OD260/OD280 y OD260/OD230, escogiendo para los análisis posteriores las muestras de ARN con ratio OD260/OD280 entre 1.9 y 2.1 y relación OD260/OD230 en el rango de 2.0-2.2. Además, la calidad e integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% (p/v) con GreenSafe Premium (NZYtech). Las muestras de ARN se almacenaron a -80°C para su posterior uso para la identificación de genes en los distintos materiales y análisis de expresión.

3.3.2 Identificación y clonación de genes en Fagáceas

Se diseñaron cebadores específicos a partir de secuencias de otras especies obtenidas de las bases de datos del NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y de la de la web “Fagaceae Genomics Web” <http://www.fagaceae.org/>, que tenían homología con los genes de interés, usando el

software PRIMER EXPRESS 3.0 (Applied Biosystems). Posteriormente y a partir de las secuencias específicas procedentes de los fragmentos obtenidos, se diseñaron nuevos cebadores para obtener las secuencias completas (Tabla 2) mediante PCR RACE y/o PCR tradicional. Los cebadores se diseñaron usando la web Primer3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012).

Tabla 2.- Cebadores específicos usados para la obtención de los ADNc de CPE, TCTP y AGO en castaño, alcornoque y roble

Cebador	Secuencia	T _m
AGO1 F1	5'GCCTGGCAAGGGTAGCACTGGA 3'	70 °C
AGO1 F2	5'AGTCCAGCCTCAGGGGAAGGAGCTT 3'	71 °C
AGO1 F3	5'TCGCAAGGCATGTGCTTCTTTGGA 3'	72 °C
AGO1 F4	5'TGCTGCTGTGAGACCCCTACCTGCA 3'	69 °C
AGO1 R1	5'GTCAAGCAGCACTGCGAAACAAGTCC 3'	67 °C
AGO1 R2	5'CGATAGAAAAGGGAGAGGCCAGCA 3'	66 °C
AGO1 R3	5'TAAATCAGTGAGGTTCCCCCTTCGG 3'	69 °C
AGO4 F1	5'CAGCCACCCAAATGGGTCAGTTCA 3'	65 °C
AGO4 F2	5'TGAAAAGCCGTTTGTTTTAGC 3'	56 °C
AGO4 F3	5' TGTTCTTGCTGCAGAGGAT 3'	59 °C
AGO4 R1	5'CCAGGGGAGGCCACACCAGAAACA 3'	68 °C
AGO4 R2	5' TGGTACATCAGACTGCCCAG 3'	59 °C
AGO5 F1	5'GTTTTTGCCTGCCCTTCAAGCTGGT 3'	65 °C
AGO5 F2	5'TGGCTCTCAAGATCAATGTGAAGGCTGGGG 3'	70 °C
AGO5 R1	5'CAATTGGCCGTTGACACGTTGCTCT 3'	65 °C
AGO5 R2	5'TTTGGTTACCTCCGGCCAAT 3'	60 °C
CPE F	5'-AAGGAAAATGGCTTACTCAAAGAC-3'	58 °C
CPE R	5'-AGACCGACCAAAATTAGATTAATCC-3'	59 °C
TCTP F1	5'GGATGCTGTGGGAAGTGGAGGGAAA 3'	72 °C
TCTP F2	5'ATCAGGATCTTCTCACTGCTGATG 3'	63 °C
TCTP F3	5'TCTCACGCTCTCTCAATCTCA 3'	58 °C
TCTP R1	5'GCAGGTTGTTCTGAAGCCGAAAGG 3'	71 °C

Como molde para obtener las secuencias de los genes objeto de este estudio usamos ADN complementario (ADNc) obtenido mediante retrotranscripción del ARN total extraído de los distintos materiales. Para la síntesis de la primera cadena del ADNc se usó 1 µg de ARN total aislado y la enzima retrotranscriptasa PrimeScript (Takara, Dalian, China). Se sintetizaron

poblaciones 3' y 5' de ADNc usando el kit “SMART[™] RACE ADNc Amplification Kit” (Clontech, Takara Bio Company, Japan). En el caso de la síntesis de la primera cadena de 5'ADNc, la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en presencia del oligonucleótido SMART II[™] A y un cebador oligo (dT) modificado (5'CDS) que incluye dos posiciones de nucleótidos degenerados en el extremo 3' (Tabla 3). La síntesis de la primera cadena 3'ADNc se sintetizó usando un procedimiento de retrotranscripción tradicional pero en presencia de un cebador oligo (dT) especial (3'-CDS) que incluye las posiciones de nucleótidos degeneradas como en el cebador 5'-CDS y una porción de la secuencia SMART en su extremo 5' (Tabla 3).

Tabla 3.- Oligonucleótidos usados para la síntesis de la primera cadena de ADNc.

Oligonucleótidos	Secuencia
SMART II [™]	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'
3'-CDS	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ V N 3' (N = A, C, G, o T; V = A, G, o C)
5'-CDS	5'-(T) ₂₅ V N-3' (N = A, C, G, o T; V = A, G, o C)
UPM	Long: 5'CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAA CGCAGAGT3' Short: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC -3'

Los fragmentos 3' y 5' se generaron mediante reacciones de PCR RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). La primera cadena de 3' o 5' ADNc obtenida mediante retrotranscripción se usó directamente en las reacciones de PCR-RACE 3' o 5' para sintetizar y amplificar la doble cadena de ADNc. La reacción fue catalizada por la mezcla de polimerasas Advantage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech, Takara Bio Company, Japan) en presencia de un cebador específico (Tabla 2) y el Universal primer mix (UPM) que reconoce la secuencia SMART II (Tabla 3).

En algunos casos se obtuvo la secuencia mediante PCR usando dos cebadores específicos y utilizando como molde los mismos ADNc. Algunos fragmentos se obtuvieron usando Advantage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech, Takara Bio Company, Japan) y otros usando la polimerasa Phire[™] Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific[™], EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada RACE y PCR se ajustaron las concentraciones de los cebadores, ADNc y dNTPs así como las condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos de PCR, (Tablas 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Tabla 4.- Composición de la reacción de RACE

Componente	Volumen final = 25 µl	Concentración final
H ₂ O _d	17,25 µl	
10X Advantage [®] 2 SA Buffer	2,5 µl	1X
dNTP Mix (10mM)	0,5 µl	0,2 mM
ADNc (9,1 ng/µl)	1,25 µl	0,45 ng/µl
Cebador específico (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
UPM (10X)	2,5 µl	1X
50x Advantage [®] 2 Polymerase Mix	0,5 µl	1X

Tabla 5.- Perfil térmico de las reacciones de RACE

Paso del ciclo	Programa 1 (T _m >70°C)			Programa 2 (T _m =60-70°C)		
	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	5	--	--	--
Unión de los cebadores	--	--		--	--	
Extensión	72°C	1min/kb		--	--	
Desnaturalización	94°C	30 s	5	--	--	--
Unión de los cebadores	70°C	30 s		--	--	
Extensión	72°C	1min/kb		--	--	
Desnaturalización	94°C	30 s	30	94°C	30 s	40
Unión de los cebadores	68°C	30 s		68°C	30 s	
Extensión	72°C	1min/kb		72°C	1min/kb	
Extensión final	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1
	4°C	∞		4°C	∞	

Tabla 6.- Composición de la reacción de PCR catalizada por Advantage[®] 2 Polymerase Mix

Componente	Volumen final = 25 μ l	Concentración final
H ₂ O	17,25 μ l	
10X Advantage [®] 2 SA Buffer	2,5 μ l	1X
dNTP Mix (10mM)	0,5 μ l	0,2 mM
ADNc (9,1 ng/ μ l)	1,25 μ l	0,45 ng/ μ l
Cebador específico Fw (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
Cebador específico Rv (10 μ M)	0,5 μ l	0,2 μ M
50x Advantage [®] 2 Polymerase Mix	0,5 μ l	1X

Tabla 7.- Perfil térmico de la reacción de PCR catalizada por Advantage[®] 2 Polymerase Mix

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	40
Unión de los cebadores	T _m	30 s	
Extensión	72°C	1 min/kb	
Extensión final	72°C	5 min	1
	4°C	∞	

Tabla 8.- Composición de la reacción de PCR catalizada por Phire[™] Hot Start II DNA Polymerase

Componente	Vol _r = 20 μ l	Concentración final
H ₂ O	11,2 μ l	
5X Buffer Phire Green	4 μ l	1X
dNTP Mix (10mM)	0,4 μ l	0,2 mM
Cebador Fw (10 μ M)	1 μ l	0,5 μ M
Cebador Rv (10 μ M)	1 μ l	0,5 μ M
ADNc (9,1 ng/ μ l)	2 μ l	0,9 ng/ μ l
Phire [™] Hot Start II DNA Polymerase (5U/ μ l)	0,4 μ l	0,1 U/ μ l

Tabla 9.- Perfil térmico de la reacción de PCR catalizada por Phire™ Hot Start II DNA Polymerase

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	1
Desnaturalización	98°C	5 s	40
Unión de los cebadores	T _m	5 s	
Extensión	72°C	10-15 s/kb	
Extensión final	72°C	1 min	1
	4°C	∞	

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa 1,2%. Los fragmentos de las longitudes esperadas se ligaron en el plásmido PCR[®] II con la enzima T4 ligasa, usando el kit de clonación TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunos casos, el producto de amplificación de interés se ligó al vector pJET1.2/blunt mediante la acción de la enzima T4 ligasa usando el kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific™, EEUU) de acuerdo con lo indicado por el fabricante. El producto de ligación se utilizó para la transformación de células competentes de *E.coli* de la cepa INVαF (genotipo F'endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169λ-; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mediante choque térmico de 42°C durante 45 segundos. Las bacterias transformadas con el vector PCR[®] II se sembraron en placas con medio LB (Luria-Bertani; Duchefa Biochemie, Haarlem) suplementado con 50 µg/L de sulfato de kanamicina (Duchefa Biochemie, Haarlem) para la selección de las bacterias transformadas. A las placas se les añadió también 1,6 mg de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, Duchefa Biochemie, Haarlem) para la selección de las bacterias que portan el inserto. Las células de *E.coli* transformadas con el plásmido pJET1.2/blunt se sembraron en medio de selección LB (Duchefa Biochemie, Haarlem) suplementado con 100 µg/L de ampicilina.

La presencia del inserto de interés en el vector se confirmó mediante PCR usando como molde la propia colonia y cebadores específicos localizados en las regiones flanqueantes del sitio de clonación del vector. La composición de esta reacción y las condiciones establecidas en el termociclador se muestran en las Tablas 10 y 11. Una vez confirmada la presencia del inserto de interés se envió al servicio de secuenciación SECUGEN.

Tabla 10.- Composición de la reacción de PCR para la confirmación de la presencia del inserto

Componente	Volumen final = 10 µl	Concentración final
H ₂ O	6,1 µl	
10X Dream Taq™ Buffer	1 µl	1X
dNTP Mix (250 µM)	0,8 µl	0,02 mM
Cebador vector Fw (2 µM)	1 µl	0,2 µM
Cebador vector Rv (2 µM)	1 µl	0,2 µM
Dream Taq™ DNA Polymerase (5U/µl)	0,1 µl	0,05 U/µl

Tabla 11.- Perfil térmico de la PCR para la confirmación de la presencia del inserto

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	40
Unión de los cebadores	60°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min/kb	
Extensión final	72°C	5 min	1
	4°C	∞	

3.3.3 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias completas de ADNc de los genes objeto de estudio se analizaron mediante varias herramientas bioinformáticas. Mediante el uso de la herramienta Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) se obtuvieron las secuencias aminoacídicas deducidas de los distintos ADNc identificados. Los análisis de homología de las secuencias de ADN y de proteína deducida se realizaron usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) de las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Pearson y Lipman 1988). La predicción de los parámetros moleculares como punto isoelectrico y peso molecular se realizó usando la herramienta ProtParam de la web ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). Los motivos conservados de las proteínas predichas se analizaron usando la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2015) la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) y la base de datos Conserved Domain Database (CDD) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

En el caso del estudio de CPE en diferentes especies se usó el servidor SignalP 4.0 para predecir el péptido señal y sitio de escisión (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011) y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/index.html>) para predecir las regiones N, H y C del

péptido señal (Käll *et al.*, 2004). También se utilizaron varias herramientas para la predicción de la localización subcelular de proteínas eucariotas como EuLoc (<http://euloc.mbc.nctu.edu.tw/index.html>) (Chang *et al.*, 2013), YlocPlants (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>) (Briesemeister *et al.*, 2010a, 2010b) o la herramienta Plant-mPloc de predicción de múltiples sitios de localización (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) (Chou y Shen, 2010).

La identificación de dominios proteicos, familias y sitios funcionales en las secuencias aminoacídicas se realizó mediante búsqueda de motivos característicos en la base de datos PROSITE de patrones o perfiles derivados de alineamientos múltiples de secuencias homólogas (C. J. A. Sigrist *et al.*, 2012; C. J. a Sigrist *et al.*, 2002) usando la herramienta ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) (de Castro *et al.*, 2006). Para identificar los elementos reguladores conservados en plantas, la secuencia promotora de los genes se analizó usando la base de datos PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot *et al.*, 2002).

3.3.4 Análisis filogenético

Mediante búsqueda por homología en las bases de datos del NCBI mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se seleccionaron secuencias homólogas representativas de diferentes especies vegetales y no vegetales para el estudio filogenético. Las secuencias seleccionadas se obtuvieron a partir de la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El alineamiento de las secuencias de las proteínas predichas y las seleccionadas de otras especies se realizó con el programa ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 1997) usando la matriz Gonnet o matriz BLOSUM y se editó con el programa BioEdit (Hall *et al.*, 2011).

Para revelar las relaciones evolutivas de las proteínas identificadas en este trabajo con otras proteínas de otras especies vegetales y animales, se generaron arboles filogenéticos a partir de los alineamientos obtenidos previamente con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con 1000 replicados de bootstrap (Felsenstein, 1985). El árbol se dibujó a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de corrección de Poisson (Zuckerkandl y Pauling, 1965) y se corresponden con las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Se eliminaron todas las posiciones que contenían huecos y los arboles se editaron con el programa FigTree (Tree Figure Drawing Tool v1.4.2, 2006-2014, Andrew Rambaut, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh).

3.3.5 Predicción de la estructura 2D y 3D

La estructura secundaria de las proteínas deducidas a partir de los genes aislados se predijo con el programa Stride (Frishman y Argos, 1995). Para la predicción de la estructura 3D, las secuencias de aminoácidos completas de cada una de las proteínas se subieron al programa automático de modelado de estructuras por homología SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Este servidor construye un modelo para cada proteína diana usando como molde, estructuras de proteínas homólogas que han sido determinadas experimentalmente (Arnold *et al.*, 2006; Biasini *et al.*, 2014; Kiefer *et al.*, 2009). Se escogió como molde la estructura obtenida experimentalmente más adecuada según la bibliografía para cada una de las proteínas. La aplicación Swiss PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) se usó para visualizar las estructuras 3D predichas y para localizar los residuos de interés (Guex y Peitsch, 1997; Johansson *et al.*, 2012). Todos los gráficos moleculares se realizaron con el programa Discovery Studio 4.1 Visualizer (Accelrys Software Inc.CA, EEUU).

3.3.6 Análisis de la expresión de los genes de interés

3.3.6.1 PCR cuantitativa (qPCR)

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total extraído usando el kit de retrotranscripción High Capacity ADNc Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores para PCR cuantitativa se diseñaron usando el software PRIMER EXPRESS 3.0 (Applied Biosystems, Life technologies). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 12. Mediante PCR y posterior electroforesis se comprobó que los productos amplificados con cada pareja de cebadores correspondían a un único amplicón de aproximadamente 100 pb. La eficiencia de los cebadores se estimó mediante diluciones del ADNc usando una curva estándar para cada gen. La expresión de los tres genes de referencia, *Actina* (Soler *et al.*, 2008), *Ubiquitina* y *Factor de elongación* (Marum *et al.*, 2012), seleccionados previamente basándose en su estabilidad durante el desarrollo embrionario, se usó como control interno para normalizar los datos de expresión. Se comprobó que estos genes endógenos eran estables en nuestro material y que no presentaban desviaciones de más de un ciclo entre todas las muestras. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 48 pocillos con el equipo Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), mediante el uso de SYBR Green Master Mix para monitorizar la síntesis de ADN de doble cadena. Se añadieron 300-350 nM (Tabla 12) de cada cebador, 1,3 µl de muestra de ADNc (10,83 ng de ARN de entrada) y 1x SYBR® Green PCR master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a un volumen final de 20 µl. El perfil térmico de PCR usado fue: 50°C/2 min, 95°C/10 min, 40 ciclos de 95°C/ 15 s, y 60°C/ 1 min. Al final de los ciclos de PCR se generaron las curvas “melting” para comprobar que se amplificaba un solo producto. Se

llevaron a cabo tres replicados biológicos y tres técnicos para cada muestra en cada ensayo. Los valores de expresión relativa se expresaron mediante el método de comparación de CT y utilizando como referencia los valores de los embriones en estadio globular. Todos los cálculos y normalizaciones se realizaron usando el software DataAssistTM software (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor. Cuando los datos presentaron homogeneidad de varianzas se usó el test de Duncan con diferencias significativas para $P \leq 0,05$. En el caso de no presentar homogeneidad de varianzas, se usó el test de Tukey y las diferencias entre los resultados se consideraron significativas a $P \leq 0,05$.

Tabla 12.- Cebadores específicos usados para qPCR y concentraciones usadas en los experimentos de PCR

Cebador específico	Secuencia	Concentración
CPEq F	5'TGTGCAAACTGACGCAGTGA 3'	350 nM
CPEq R	5'ATGACCTGGTTTGCCATGGT 3'	350 nM
TCTPq F	5'TCCTTTGGAACCTGTGGAAGA 3'	300 nM
TCTPq R	5'ACCATCACCACCACAGAAGAA 3'	300 nM
ACTq F	5'GCCCCACGAGCTGTGTTC 3'	350 nM
ACTq R	5'TCTGGCCCATTCCAACCA 3'	350 nM
EFq F	5'TTGTGCCGTCCTCATTATTGACT 3'	350 nM
EFq R	5'TCACGGGTCTGACCATCCTT 3'	350 nM
Ubq F	5'AGGAATCAACCCTTCACCTTGTC 3'	300 nM
Ubq R	5'GAACTCTCCACCTCCAAAGTGATG 3'	300 nM

3.3.6.2 Hibridación *In situ*

Las muestras embebidas en Jung Tissue Freezing medium (Leyca Microsystems Nussloch GMBH, Heidelberg, Germany) se cortaron en secciones de 10 μm usando un criostato Leyca CM1850. Las secciones se recogieron en portaobjetos de cristal tratados con 3-aminopropyltriethoxisilan para mejorar su adherencia. Los cortes se secaron en una placa térmica a 40°C y se fijaron en 3:1 (v/v) etanol: ácido acético glacial durante 10 minutos seguido de 5 minutos en etanol 70% a 4 °C.

Los fragmentos correspondientes a la región más específica de cada gen se clonaron en el vector PCRII[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que contiene los promotores T7 y SP6 y se amplificaron por PCR usando los cebadores T7 y SP6. El fragmento de PCR flanqueado por los promotores SP6 y T7 se usó como molde para transcribir las sondas antisentido y sentido usando ARN polimerasa SP6 y T7, respectivamente. Se sintetizaron ribosondas de ARN

monocatenario específicas para cada gen marcadas con digoxigenina usando el kit DIG ARN labeling kit (SP6/T7) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Las sondas se hidrolizaron parcialmente hasta una longitud aproximada de 150 nt mediante tratamiento alcalino. Las sondas sentido se usaron como control negativo.

La hibridación *in situ* se realizó según el protocolo descrito por Sánchez *et al.* (1995). Las secciones se sometieron a una serie de pretratamientos para permitir la accesibilidad de la sonda al ARNm diana, permeabilizando las membranas celulares y eliminando o modificando las proteínas en estrecha asociación con los ácidos nucleicos con Proteinasa K (1 µg/ml) evitando así hibridaciones inespecíficas. Tras la hibridación de las sondas específicas al ARNm diana, las muestras se sometieron a tratamientos de post-hibridación para eliminar hibridaciones inespecíficas y los restos de ribsonda no hibridada con RNasa A (5 µg/ml). La detección de los híbridos antigénicos se realizó mediante reacción inmunohistológica directa con anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany Roche) y posterior incubación con el cromógeno NTB/BCIP (Sigma-Aldrich). La actividad de la enzima fosfatasa alcalina cataliza la precipitación del cromógeno en un producto coloreado que se deposita sobre el lugar de la reacción. Finalmente las secciones se deshidrataron pasándolas por una serie de diluciones de etanol en concentración ascendente, se secaron a temperatura ambiente y se montaron en medio de montaje Eukit (O. Kindler, GmbH&Co., Freiburg, Germany). Las fotografías se tomaron con una cámara digital Olympus en un microscopio Nikon bajo iluminación de campo claro.







4. Genes *AGO* (*Argonauta*)

4.1 Introducción

4.1.1 Silenciamiento mediado por ARN

La interferencia mediada por ARN se refiere a un proceso de silenciamiento génico que constituye un mecanismo conservado de regulación de la expresión génica basado en el uso de pequeños ARNs de ~21-26 nt (sARNs) como guía para identificar un ARN diana, proceso que esta mediado por las proteínas Argonautas (AGOs) (Carmell *et al.*, 2002; Höck y Meister, 2008; Hutvagner y Simard, 2008; Mi *et al.*, 2008). Este proceso, que puede operar tanto a nivel transcripcional como post transcripcional (Zilberman *et al.*, 2003), está implicado en defensa anti-viral, silenciamiento de transgenes, metilación de ADN y desarrollo vegetal (Baulcombe, 2004; Eulalio *et al.*, 2008; Hutvagner y Simard, 2008; Axtell, 2013).

Los sARNs se procesan a partir de ARNs de doble cadena o parcialmente de doble cadena mediante las proteínas Dicer o DICER-LIKE (DCL) (Baulcombe, 2004; Meister, 2013). Las distintas especies de sARNs difieren en biogénesis y funciones. Los miARNs son generados por DCL1 (Reinhart *et al.*, 2002; Kurihara y Watanabe, 2004; Qi *et al.*, 2005). En plantas existe una clase adicional de siARN degradativos que actúan en trans (ta-siARNs) que son procesados por DCL4 (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Gasciolli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005), y los denominados siARNs heterocrómicos (hc-siARNs) que son producidos por DCL3 (Xie *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 2006). También se han descubierto tipos adicionales de sARNs incluyendo siARNs derivados de transcritos naturales antisentido (nat-siARNs) (Borsani *et al.*, 2005), siARNs largos (lsiARNs) (Pontes *et al.*, 2006), miARNs largos (lmiARNs) procesados por DCL3 (Wu *et al.*, 2010), sARNs inducidos por rotura de doble cadena (DSB) (diARNs) (Wei *et al.*, 2012), y siARN independientes de DCL (Ye *et al.*, 2016). Mientras que miARNs, ta-siARNs y nat-siARNs median el silenciamiento génico posttranscripcional (PTGS), hc-siARNs, lmiARNs y sidARNs dirigen la metilación del ADN induciendo por tanto silenciamiento génico transcripcional (TGS).

Hay varios tipos de mecanismos de silenciamiento mediado por ARN, que difieren en el tipo de sARN y en el resultado del proceso (Baulcombe, 2004). En el caso de silenciamiento mediante ARNi (interferencia de ARN) el sustrato de Dicer es de doble cadena, el sARN producido se denomina “short interfering ARN” (siARN) y el resultado es la destrucción dirigida de ARNs complementarios al siARN. La vía de miARN (microARN) es similar, exceptuando que el sustrato de Dicer es un ARN de repetición invertida con una estructura parcialmente de doble cadena, el sARN producido se denomina miARN y los ARNs diana pueden ser reprimidos a

nivel traduccional o degradados, dependiendo del grado de complementariedad entre el sARN y su diana. La última vía, el silenciamiento de cromatina dirigida por ARN, es similar a ARNi, pero las dianas del siARN son tanto ADN como ARNs asociados a la cromatina y el resultado es la metilación del ADN o la modificación de histonas en el locus diana.

A pesar de su diversidad, todos los sARNs se asocian con las proteínas de la familia AGO para formar el núcleo del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). El dúplex sARN producido por Dicer tiene que ser desenrollado en un proceso dependiente de ATP. La hebra antisentido de este ARN, denominada hebra guía, se une a una proteína AGO para formar el RISC maduro, mientras que la hebra sentido del dúplex llamada hebra pasajera se desplaza y se degrada durante el proceso de activación del RISC (Tomari, Matranga, *et al.*, 2004). Las proteínas AGO usan la información de secuencia del sARN para localizar y silenciar ARNs diana complementarios (Peters y Meister, 2007; Vaucheret, 2008). Los ARNs diana son silenciados por a) escisión directa mediante la reacción de “slicing” endonucleolítica catalizada por algunas proteínas AGO (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004), b) mediante reclutamiento de factores adicionales de silenciamiento mediado por AGO (Behm-Ansmant, 2006; Braun *et al.*, 2011; Fabian *et al.*, 2011), c) causando arresto traduccional o d) induciendo la inactivación transcripcional (Baumberger y Baulcombe, 2005; Peters y Meister, 2007; Vaucheret, 2008). El tamaño y la composición de los RISC varía (Pham *et al.*, 2004; Baumberger y Baulcombe, 2005), pero las proteínas AGO son componentes comunes en todos los sistemas.

La carga de sARNs en AGO y la determinación de la cadena que se va a mantener en el RISC maduro está regulada, aunque no siempre, por proteínas como R2D2 (Liu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2004; Tomari *et al.*, 2004), HYPONASTIC LEAVES1 (Eamens *et al.*, 2009; Manavella *et al.*, 2012) o por chaperonas como la chaperona molecular HSP90 y sus cochaperonas (Iki *et al.*, 2010, 2012; Earley y Poethig, 2011; Ye *et al.*, 2012; Röhl *et al.*, 2013) y HSC70/HSP90 (Iwasaki *et al.*, 2010, 2015; Miyoshi *et al.*, 2010).

Para su adecuado funcionamiento, los sARNs necesitan ser correctamente integrados en complejos AGO específicos. La especificidad de la clasificación de los sARNs en AGOs está determinada por la estructura de los dúplex (Tomari *et al.*, 2007; Czech *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014), por la identidad del nucleótido 5' (Mi *et al.*, 2008; Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008), así como por la maquinaria de biogénesis de sARN (Wu *et al.*, 2010). AtAGO1 y AtAGO10 se unen preferencialmente a los sARNs con una 5'-uridina (U), mientras que AtAGO2, AtAGO4, AtAGO8 y AtAGO9 prefieren sARNs que tengan una 5'-Adenina (A) (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2012), y en el caso de AtAGO5 tiene mayor afinidad por sARNs que contengan 5'-Citosina (C) (Takeda *et al.*, 2008). Por otra parte, cada

AGO tiene especificidad por sARNs de un tamaño concreto, por ejemplo AtAGO10 se une preferencialmente a sARNs de 21 nt de longitud, mientras que AtAGO4, AtAGO6 y AtAGO9 se unen a sARNs endógenos de 24 nt (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Otra especificidad viene dada por la maquinaria de procesamiento de los sARNs, así en el caso de AtAGO1 se une a miARNs que son procesados por DCL1 y a ta-siARN procesados por DCL4 (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008), mientras que AGO4 tiene preferencia por miARNs que son procesados por DCL3 (Qi *et al.*, 2006). Además, el 82% de los sARNs que se asocian con AtAGO1 son miARNs (Mi *et al.*, 2008).

4.1.1.1 Mecanismos de acción de los complejos AGO/sARN en plantas

Los complejos AGO/sARN tienen diferentes modos de acción: regulación génica a nivel post transcripcional a través de escisión endonucleolítica e inhibición traduccional (Rogers y Chen, 2013), secuestro de miARNs específicos (Zhu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015), regulación génica a nivel traduccional a través de metilación del ADN (Law y Jacobsen, 2010) o reparación DSB (“double-strand break”) (Wei *et al.*, 2012; Ba y Qi, 2013) (Figura 10 y Figura 11).

No todas las proteínas AGO tienen actividad catalítica, pero se ha demostrado que AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 y AGO10 tienen actividad “slicer” que cataliza la escisión endonucleotídica dirigida por sARN de los ARNs diana (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005, 2006; Montgomery *et al.*, 2008; Carbonell *et al.*, 2012). El mecanismo subyacente de la elección entre escisión del ARNm y la inhibición traduccional no está claro (Figura 10A y B). En un primer momento se pensaba que el grado de complementariedad entre un sARN y su diana actuaba como un interruptor entre la escisión de ARNm y la inhibición traduccional, ya que AGO1 de *Arabidopsis* se une a miARNs que muestran un alto grado de complementariedad de secuencia con sus mARNs diana (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005) y dirigen su escisión (Llave *et al.*, 2002; Rhoades *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). En el caso de animales, los miARNs son parcialmente complementarios a sus dianas y regulan la expresión génica vía inhibición traduccional y/o desestabilización del ARNm (Lewis *et al.*, 2003; Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que muchos miARNs de plantas también son capaces de reprimir la traducción (Aukerman y Sakai, 2003; Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007; Brodersen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). Finalmente se sugirió que la compartimentación sub-celular de AGO1-miARN puede jugar un papel en dicha elección (Brodersen *et al.*, 2008, 2012; Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

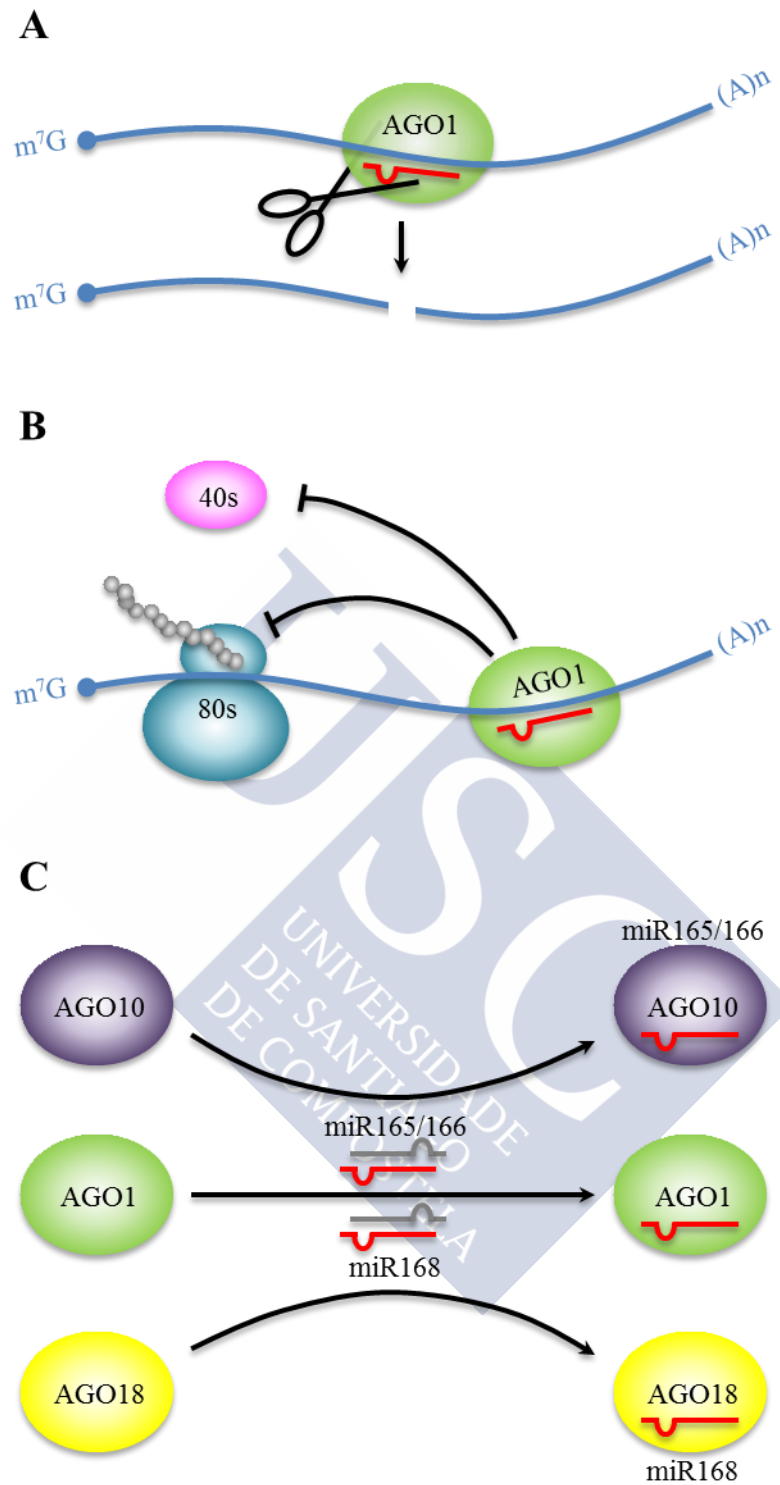


Figura 10.- Modos de acción de las proteínas AGO vegetales representativas del clado I (AGO1/5/10).

- (A) AGO1 se une a miARNs o ta-siARNs y escinde mRNA diana
- (B) AGO1 se une a miARNs e inhibe la traducción de mRNA diana.
- (C) AGO10 de *Arabidopsis* y AGO18 de arroz actúan como señuelos para miR165/166 y miR168 respectivamente.

Adaptado de Fang y Qi (2016)

Por otra parte, se ha demostrado que dos proteínas AGO vegetales, AGO10 en *Arabidopsis* y AGO18 en arroz, compiten con AGO1 por miARNs específicos y suprimen su actividad a través del secuestro de esos miARNs (Zhu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015) (Figura 10 C). AGO10 de *Arabidopsis* se une predominantemente a miR165/166, evitando de este modo su carga en AGO1 (Zhu *et al.*, 2011). En arroz, AGO18 se induce por infección vírica y se asocia preferentemente con miR168 que dirige a AGO1 (Wu *et al.*, 2015). Esta asociación disminuye la escisión dirigida por miR168 de AGO1, lo que aumenta los niveles de acumulación de AGO1 y la defensa antiviral. Cuando actúan como señuelos, AGO10 de *Arabidopsis* y AGO18 de arroz no tienen capacidad de escisión de los mARNs diana, aunque ambas AGOs contienen la triada catalítica para la actividad “slicing” (Zhu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015).

Otra acción de las proteínas AGO es la metilación del ADN, que en plantas puede ser mediada por AGO4 unida a siARNs a través de una vía especializada de ARNi denominada metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) (Figura 11A). La RdDM implica la generación de ARN de doble cadena (dsARN) por las actividades coordinadas de la ARN polimerasa IV (Pol IV) y la ARN polimerasa 2 dependiente de ARN (RDR2) (Xie *et al.*, 2004; Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Haag *et al.*, 2012). Los ARNs de doble cadena son posteriormente procesados por DCL3 para producir siARNs (Xie *et al.*, 2004) que se exportan al citoplasma, donde son cargados en AGO4, y los complejos AGO4/siARN maduros se transportan selectivamente al núcleo (Qi *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2012) donde se enganchan a los loci diana mediante apareamiento de bases con los transcritos generados por la ARN polimerasa Pol V (Pontier *et al.*, 2005; Mosher *et al.*, 2008; Wierzbicki *et al.*, 2008, 2009). Los complejos AGO4/siARN reclutan además a DRM2, una metiltransferasa clave para metilar el ADN diana (Cao y Jacobsen, 2002; Zhong *et al.*, 2014).

El último mecanismo de acción está relacionado con la reparación DBS, que es la forma más perjudicial de daño de ADN y plantea una grave amenaza para la estabilidad del genoma si no se repara correctamente (Ciccía y Elledge, 2010) (Figura 11B). Entre los diferentes tipos de sARNs, hay una clase de siARNs de 21 nt que parecen jugar un papel esencial en la reparación DSB en *Arabidopsis* y células de mamíferos (Wei *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, los diARNs se producen a partir de las inmediaciones de los sitios DSB de una manera dependiente de Pol IV. En humanos, Ago2 es necesaria para el reclutamiento de la proteína reparadora Rad51 y facilitar la reparación del ADN (Gao *et al.*, 2014). Aún queda por investigar si los complejos AGO2/diARN en *Arabidopsis* funcionan a través de un mecanismo similar.

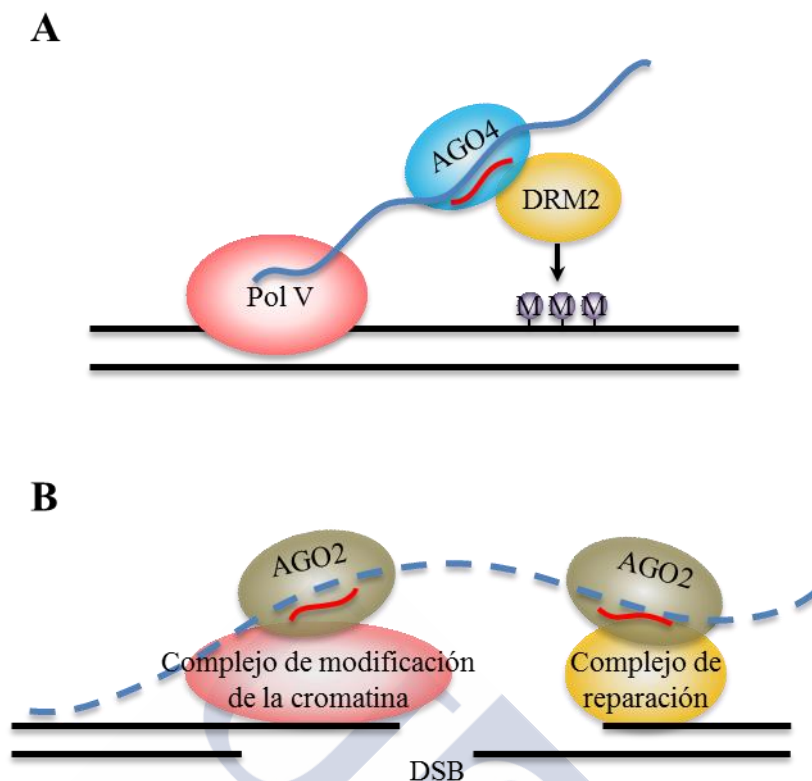


Figura 11.- Modos de acción de las proteínas AGO vegetales representativas de los clados II (AGO 2/3/7) y III (AGO4/6/8/9).

- (A) AGO4 se une a hc-siARNs o lmiARNs y media la metilación de ADN.
 (B) AGO2 se une a diARNs y media la reparación DSB.

Adaptado de Fang y Qi (2016)

4.1.2 Familia de proteínas ARGONAUTA (AGO)

La primera AGO fue identificada buscando genes implicados en el desarrollo de *A. thaliana* y dio el nombre a la familia. El silenciamiento de AtAGO1 da lugar a hojas con forma tubular que se parecen a calamares pequeños (*Argonautus argus*) (Bohmert *et al.*, 1998), de ahí su denominación. Posteriormente las AGOs se encontraron en bacterias, archaea y eucariotas, lo que indica que tienen un origen antiguo (Cerutti y Casas-Mollano, 2006). En eucariotas, basándose tanto en sus relaciones filogenéticas como en su capacidad para unirse a sARNs, las proteínas AGOs se clasifican en tres grupos: la subfamilia AGO-like, similar al miembro fundador AGO1 de *A. thaliana*, que se unen a los microARNs (miARNs) y a los pequeños ARNs interferentes (siARNs); la subfamilia PIWI-like, estrechamente relacionada con la proteína PIWI de *Drosophila melanogaster*, cuyos miembros se unen a los ARNs interactuantes con PIWI (piARNs), que son sARNs más largos (26-31 nt) que los siARNs y miARN (21-24 nt) y la subfamilia WAGO (Worm-specific Argonautes) que se une a siARNs secundarios (Yigit *et al.*, 2006; Tolia y Joshua-Tor, 2007; Hutvagner y Simard, 2008). Mientras que se ha visto que

las plantas solo codifican parálogos AGO-like, los genomas de animales albergan representantes de ambos grupos y los protistas Amoebozoa solo tienen genes PIWI-like (Hutvagner y Simard, 2008). El tercer grupo de AGOs (WAGO), es específico de *C. elegans* (Yigit *et al.*, 2006). Los miembros de las subfamilias PIWI y Argonauta poseen los residuos característicos de unión a metal DDH en sus dominios PIWI, mientras que la mayoría de las proteínas WAGO carecen de ellos (Höck y Meister, 2008; Hutvagner y Simard, 2008; Scholthof *et al.*, 2011).

Las proteínas Argonautas están muy conservadas entre especies y muchos organismos codifican múltiples miembros de estos genes. El número de genes *AGO* varía desde 1 (*Schizosaccharomyces pombe*) a 27 en *C. elegans* (Yigit *et al.*, 2006; Höck y Meister, 2008). En mamíferos se identificaron 8 genes Argonauta y 5 en el genoma de *D. melanogaster* (Hutvagner y Simard, 2008; Vaucheret, 2008). En general, se cree que los genes *AGO* han experimentado múltiples eventos de duplicación génica, principalmente en los genomas de plantas, donde la familia de proteínas AGO se ha expandido durante la evolución (Höck y Meister, 2008). Las plantas inferiores como el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y el musgo *Physcomitrella patens*, contienen 3 y 6 miembros respectivamente (Axtell *et al.*, 2007; Casas-Mollano *et al.*, 2008; Arif *et al.*, 2013; Voshall *et al.*, 2015), mientras que las plantas superiores como *O. sativa* y *A. thaliana* contienen 19 (OsAGOs) y 10 (AtAGOs) miembros, respectivamente (Morel *et al.*, 2002; Baulcombe, 2004; Kapoor *et al.*, 2008). En otras plantas, como en tomate se han identificado 15 AGOs (Bai *et al.*, 2012), 18 en maíz (Qian *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2014) y 15 en *P. trichocarpa* (Zhao *et al.*, 2015).

4.1.2.1 Estructura de las proteínas AGO

Las estructuras de los dominios de las AGOs eucariotas o de AGOs enteras de procariotas (Hall, 2005; Jinek y Doudna, 2009), así como las estructuras de alta resolución de las AGOs humanas, AGO2 (Elkayam *et al.*, 2012; Schirle y MacRae, 2012) y AGO1 (Faehnle *et al.*, 2013; Nakanishi *et al.*, 2013) y de AGO de *Kluyveromyces polysporus* con ARN guía (Nakanishi *et al.*, 2012) ayudaron a profundizar en el conocimiento de las estructuras y de sus funciones en eucariotas. Las proteínas AGO son básicas y altamente conservadas de aproximadamente 100 kDa con dominios estructurales y motivos aminoacídicos típicos. Las de eucariotas tienen cuatro dominios característicos: el dominio N-terminal variable, y otros tres conservados que son el dominio PAZ central (Piwi, Argonauta y Zwiller), el PIWI C-terminal (“P-element induced wimpy testis”) y el MID localizado entre los dominios PAZ y PIWI (Song *et al.*, 2004; Tolia y Joshua-Tor, 2007; Hutvagner y Simard, 2008; Vaucheret, 2008).

El dominio MID tiene un bucle rígido de especificidad nucleotídica (“nucleotide specificity loop”) que reconoce el nucleótido 5’ de los sARNs y determina las preferencias de unión de las diferentes proteínas AGO a sARNs con diferentes nucleótidos 5’ (Frank *et al.*, 2010, 2012). La

interfaz MID-PIWI contiene un sitio básico de unión que ancla el fosfato 5' de los sARNs en las proteínas AGO (Parker *et al.*, 2005). El dominio PIWI adopta un plegamiento similar a la familia ARNasa H de ribonucleasas y permite a algunas proteínas AGO, escindir el ARN diana complementario al sARN (Song *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2005). La actividad de escisión o “slicer” es llevada a cabo por un sitio activo que alberga una tríada catalítica característica (Asp-Asp-His/Asp, DDH/D) que es funcionalmente equivalente a la tríada DDE de la RNasa H (Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2005), aunque la presencia de un motivo DDH no implica necesariamente la actividad “slicer” (Peters y Meister, 2007; Vaucheret, 2008). Posteriormente se sugirió que la responsable de la actividad “slicer” es una tétrada catalítica con un aminoácido catalítico Glu adicional (DEDH/D) en el sitio activo, en lugar de una tríada (Nakanishi *et al.*, 2012). El dominio PAZ (~100 aa) se une al extremo 3' de los sARNs (Tolia y Joshua-Tor, 2007), mediante reconocimiento y anclaje de los 2 nt del extremo 3' y dentro de un sitio de unión específico del dominio PAZ (Lingel *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005; Elkayam *et al.*, 2012). Además el dominio PAZ contribuye al desenrollamiento de los dúplex de manera independiente del slicing (Gu *et al.*, 2012). El dominio N-terminal es el más variable tanto en términos de longitud como de conservación de secuencia y probablemente (a) facilita la separación de los dúplex sARN-mARN, (b) se requiera para desenrollamiento del dúplex de sARN y (c) regule la actividad de escisión en el ARNm diana mediante la interacción con el extremo 3' del ARN guía (Kwak y Tomari, 2012; Hauptmann *et al.*, 2013; Hur *et al.*, 2013).

4.1.2.2 Filogenia de las proteínas AGO vegetales

Las 10 AGOs de *A. thaliana* se distribuyeron inicialmente en tres clados filogenéticos. El clado I (AtAGO1, AtAGO5 y AtAGO10), el CladoII (AtAGO2, AtAGO3 y AtAGO7) y el Clado III (AtAGO4, AtAGO6, AtAGO8 y AtAGO9) (Vaucheret, 2008), mientras que los 18 genes AGO de *O. sativa* se dividieron en 4 clados (Kapoor *et al.*, 2008). Recientemente se propuso un modelo para la historia evolutiva de la familia de proteínas AGO de plantas y se distribuyeron filogenéticamente en los siguientes 4 clados o clases principales. El Clado I con los homólogos de AGO1 y AGO10, el Clado III con los homólogos de AGO2, 3 y 7, el Clado IV con los homólogos de AGO4, 6, 8 y 9 y finalmente el Clado II en el que se incluyeron los homólogos a AGO5, que formaban un grupo independiente que parece haber divergido después de la evolución de la multicelularidad, pero antes de la divergencia de las plantas superiores, lo que sugiere un papel fisiológico, posiblemente diferente de las que regulan procesos de desarrollo (Singh *et al.*, 2015). El primer clado en divergir podría haber sido el Clado IV, seguido por Clado III, Clado II y Clado I, respectivamente. El hecho de que la diversificación y duplicación de los AGOs pudiera haber coincidido con la evolución de la multicelularidad, sugiere la relevancia de las AGOs y sus vías de sARNs en el desarrollo y los programas de adaptación (Singh *et al.*, 2015). Sin embargo, de manera general, actualmente las proteínas vegetales AGO

se agrupan en tres clados principales que llevan el nombre de las AGOs de *Arabidopsis*: AGO1/5/10 AGO2/3/7 y AGO4/6/8/9 basándose en sus relaciones filogenéticas. En maíz y arroz, se incluye un subclado AGO18 que cae dentro del clado AGO1/5/10 (Fang y Qi, 2016).

4.1.2.3 Funciones de las proteínas AGO vegetales

En plantas, la expansión de la familia AGO durante la evolución (Singh *et al.*, 2015) condujo también a una diversificación funcional de las AGOs (Höck y Meister, 2008; Havecker *et al.*, 2010). La especialización de las AGOs en diferentes vías de sARN y procesos biológicos puede ser atribuida a sus propiedades bioquímicas, patrones de expresión espacio temporal, y proteínas y/o sARN con los que interactúa.

AGO1 es la proteína efectora de los miARNs y siARNs (Vaucheret *et al.*, 2004; Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2008) y regula la expresión de genes que están implicados en numerosos procesos de desarrollo y fisiológicos (Fei *et al.*, 2013; Rogers y Chen, 2013), aunque también funciona en defensa contra algunos virus (Morel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015). AGO10 muestra redundancias funcionales con AGO1 al menos durante algunos aspectos del desarrollo, aunque también puede anular sus actividades (Lynn *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2011). AGO10 juega papeles importantes en el mantenimiento de CM del MAB (Lynn *et al.*, 1999) y en el establecimiento de la polaridad de las hojas (Liu *et al.*, 2009). Además puede regular el desarrollo del meristemo (Brodersen *et al.*, 2008; Mallory *et al.*, 2009) y promover la determinación floral (Ji *et al.*, 2011), así como cooperar con AGO1 en el efecto antiviral (García-Ruiz *et al.*, 2015). AGO5 de *Arabidopsis* media la promoción de la megagametogénesis (Tucker *et al.*, 2012). De forma similar, MEIOSIS ARRESTED AT LEPTOTENE1 (MEL1 o AGO5c), uno de los cinco homólogos de AGO5 en arroz, tiene funciones específicas en el desarrollo de células germinales premeióticas y en la progresión de la meiosis durante la esporogénesis (Nonomura *et al.*, 2007). Además, AGO5, AGO 4, AGO2 y AGO18 juegan importantes papeles en defensa antiviral (Agorio y Vera, 2007; Takeda *et al.*, 2008; Brosseau y Moffett, 2015; Wu *et al.*, 2015). Por otra parte, AGO2 facilita la reparación DSB (Wei *et al.*, 2012) y AGO3 puede escindir ARNs virales *in vitro* (Schuck *et al.*, 2013). AGO4 y AGO 6 están implicadas en la metilación del ADN (Zilberman *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2006) y son mutuamente dependientes (Duan *et al.*, 2015). AGO 9 controla la formación del gameto femenino, limitando o reprimiendo la especificación de las células precursoras del gametofito (Singh *et al.*, 2011).

4.2 Resultados

4.2.1 Clonación y análisis de la secuencias CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5

A partir de tres secuencias obtenidas de la base de datos de Fagáceas (<http://www.fagaceae.org/>) con homología con genes *AGO1*, *AGO4* y *AGO5* respectivamente de distintas especies como *R. communis*, *V. vinifera*, *C. sativus*, *J. curcas*, *M. domestica* o *P. persica*, diseñamos cebadores específicos para los genes *CsAGO1* (*C. sativa AGO1*), *CsAGO4* (*C. sativa AGO4*) y *CsAGO5* (*C. sativa AGO5*) (Tabla 2, material y métodos). Como molde para obtener las secuencias de los genes *AGO* en castaño usamos un ADNc obtenido a partir del ARN total extraído de embriones somáticos cotiledonares de castaño. Para obtener la secuencia de *CsAGO1*, se llevaron a cabo reacciones RACE 3' y 5' usando los cebadores diseñados (*AGO1F1* y *AGO1 R1*) y sobre las secuencias de los fragmentos obtenidos se diseñaron nuevos cebadores para llevar a cabo nuevas reacciones. La secuencia *CsAGO4* se consiguió mediante reacciones RACE 3' y 5' usando los cebadores *AGO4 F1* y *AGO4 F2*, y reacciones de PCR usando nuevos cebadores diseñados sobre estas y sobre secuencias homólogas a *AGO4* depositadas en la base de datos de Fagáceas. Por último la secuencia parcial de *CsAGO5* se obtuvo mediante RACE usando los cebadores diseñados sobre la secuencia obtenida de la base de datos de Fagáceas (*AGO5 F1* y *AGO5 R1*) y nuevos cebadores diseñados sobre las secuencias de los productos obtenidos. Los cebadores utilizados en estas reacciones se muestran en la Tabla 2, material y métodos. El análisis de las secuencias mediante Blastx en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) confirmó que tenían homología con los genes *AGO1*, *AGO4* y *AGO5* identificados en otras especies. Las secuencias completas se obtuvieron mediante ensamblaje de las secuencias de los fragmentos obtenidos.

La secuencia de ADNc obtenida para *CsAGO1*, de 3071 pb, consta de una región codificante de 2979 pb que codifica una proteína de 992 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa y un pI (punto isoeléctrico) de 9,25 (Figura 12). La secuencia aminoacídica mostró elevada homología con proteínas AGO1 de *Glycine soja* (93%), de *P. mume* (90%), de *C. sinensis* (90%), de *R. communis* (90%), de *J. curcas* (89%) o de *V. vinifera* (88%) entre otras, por lo que la denominamos *CsAGO1*. La secuencia de ADNc obtenida para *CsAGO4* tiene 2913 nucleótidos y una región codificante de 2787 pb que codifica una proteína de 928 aminoácidos con un peso molecular de 103 kDa y pI de 8.93 (Figura 13). Los análisis mediante BLAST en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) revelaron que era altamente homóloga a proteínas AGO4 de otras especies como *C. sativus* (88%), *P. trichocarpa* (87%), *V. vinifera* (87%), *R. communis* (86%), *S. lycopersicum* (86%) *C. melo* (85%) o *P. persica* (85%) entre otras, por lo que se denominó *CsAGO4*. Por último, los análisis de secuencia indicaron que el fragmento de ADNc obtenido en el caso de *CsAGO5* tiene 1037pb y

codifica una proteína parcial de 343 aminoácidos (Figura 14). La secuencia aminoacídica predicha mostró alta homología con otras proteínas AGO5 de distintas especies como *P. trichocarpa* (87%), *V. vinifera* (73%), *J. curcas* (72%), *M. domestica* (70%) o *R. communis* (69%) entre otras, por lo que la nombramos CsAGO5.

```

ggtgggtcgtggaatgccaccacagcagcagtatggtgggccccctgaatatcaaggcagg
      M P P Q Q Q Y G G P P E Y Q G R
ggaaggggagggccacccagcaaggtagtcgaggaggtatagtggtgggtggccacaat
      G R G G P P Q Q G S R G G Y S G G G H N
ggcgtggcataggacctctttctggcgcccatccagaccacaagttcccgaactgcac
      G R G I G P L S G G P S R P Q V P E L H
caagcaaccaggttccacatcagcctgggggtgattccacctcagtcacgctgccatct
      Q A T Q V P H Q P G V I P P Q S T L P S
gaggctagttcatcttcccaaccacctgagtcacatctcaagtgggtctcatcttttaataca
      E A S S S S Q P P E S S Q V V S S F N T
ctaacaatcgaagaagtttctggtcctgcccagccgattcaacctgtgccaccatctagt
      L T I E E V S G P A Q P I Q P V P P S S
aaatcagtgagggttcccccttcggcctggcaagggtagcactggaacaaatgtatggtt
      K S V R F P L R P G K G S T G T K C M V
aaggctaaccacttcttggcgagttaccagacaaagatctgcaccagtatgatgtttct
      K A N H F F A E L P D K D L H Q Y D V S
atcacaccagaggtgacatcacaggaggtcaaccgggcggaatggagcaactggtgaaa
      I T P E V T S R G V N R A V M E Q L V K
ttatataaggagacacatcttggaaagaggcttctctgcctatgatgggagaaagagtcta
      L Y K E T H L G K R L P A Y D G R K S L
tatactgctgggcctctcccttttctatcgaaggagtttaaaatcccactcattgacgaa
      Y T A G P L P F L S K E F K I P L I D E
gatgatggatcggggtggacagaggagagaaagagaatttaaagttgtgataaaactggct
      D D G S G G Q R R E R E F K V V I K L A
gcacgtgcgacacctgcaccatttaggactctttttgcagggtaggcaagctgatgcacc
      A R A D L H H L G L F L Q G R Q A D A P
caggaagcccttcaagttcttgatattgtcctgcgtgaattgccactactaggtactgt
      Q E A L Q V L D I V L R E L P T T R Y C
cccgtgggtcggttcattttattcacctgatcttggaggagggcagccattgggtgaggg
      P V G R S F Y S P D L G R R Q P L G E G
ttggagagttggcgtggtttctatcaaagtattcgtccaactcaaagtggtgattgtctctg
      L E S W R G F Y Q S I R P T Q M G L S L
aatattgatattgtcttctactgctttcattgagccattgccagtaattgaatttgtgaca
      N I D M S S T A F I E P L P V I E F V T
cagctgctgaatagggtatgtcacttcccgaccttggctctgatgctgatcggtgtgaagatc
      Q L L N R D V T S R P L S D A D R V K I
aaaaaggctctgcgaggaggtcaaagtggaggttactcacctgggaaatatgcgcaggaag
      K K A L R G V K V E V T H R G N M R R K
taccgtatatctggttttaacttcacaggcaacacgagagctgacttttctgttgatgaa
      Y R I S G L T S Q A T R E L T F P V D E
aggggtacaatgaaatctgtagttgagtacttttacgaaacttatggtttttccattcaa
      R G T M K S V V E Y F Y E T Y G F S I Q
catacgcaatggccttgtctgcaagtggggaatcaacagaggccgaattatttgcctatg
      H T Q W P C L Q V G N Q Q R P N Y L P M
gaggtttgcaagattgttgaggggtcagaggtactccaagaggttgaatgaaaggcagatt
      E V C K I V E G Q R Y S K R L N E R Q I
accgctttgctgaagggtgacctgtcagcgctcctcaagagagagagcggtgatataatgcag
      T A L L K V T C Q R P Q E R E R D I M Q
actgttgaacacaatgtttaccataatgacccatattgcaaaggagtttggaaatcaaaatc
      T V E H N V Y H N D P Y A K E F G I K I
agtgagagggtggccttcgggttgagctcgcatccttctcgtcgccatgggtgagatcat
      S E R L A S V E A R I L P A P W L K Y H
gatacaggcagagaaaaggattgcttgcccaagttggacaatggaacatgatgaataag
      D T G R E K D C L P Q V G Q W N M M N K

```

```

aaaatggtcaatgggggaacagttaacaactggatttgcattaatttttcgaggaatgtg
K M V N G G T V N N W I C I N F S R N V
caagacagtgtagcccggtgggttttgcattgaacttgcacaaatgtgttacatttctggc
Q D S V A R G F C Y E L A Q M C Y I S G
atggcatttaaatcctgaacctgtgcttccaccattgagtgctcgtcctgatcaagtggag
M A F N P E P V L P P L S A R P D Q V E
agagtcctgaaaactcggtaccatgatgccatgactaaagtccagcctcaggggaaggag
R V L K T R Y H D A M T K V Q P Q G K E
cttgacctacttattgttattttgcccagataacaacggctctcttttatggtgatttga
L D L L I V I L P D N N G S L Y G D L K
cggatttgtgagacagatcttggacttgtttcgagtgctgcttgacaaagcatgtattt
R I C E T D L G L V S Q C C L T K H V F
agaatgagtaaacatatttggcaaatgtggcacttaagattaatttcaaggtggggggc
R M S K Q Y L A N V A L K I N F K V G G
aggaataccgtgcttgttgatgcattgtcaaggcgtataccttttagtcagtgaccggcct
R N T V L V D A L S R R I P L V S D R P
actataatttttggtgctgatgtaacccatcctcatccgggagaggattcgagcccatcg
T I I F G A D V T H P H P G E D S S P S
attgcagctggttgggttctcaagattggccagaagtcacgaagtatgctggtttggtt
I A A V V A S Q D W P E V T K Y A G L V
tgtgcacaagcccacatcgacaagagctgatccaagatctattcaagacatggcaagatcct
C A Q A H R Q E L I Q D L F K T W Q D P
gttcgggggacagtttctggtggaatgatcaaagaactactcatatcttttcggagagca
V R G T V S G G M I K E L L I S F R R A
actgggcagaaaccaaacgaatcatattttacagggatggtgtgagtgaaggccagttc
T G Q K P K R I I F Y R D G V S E G Q F
tatcaagttttgtgtatgagctagatgctattcgcaaggcatgtgcttctttggagcca
Y Q V L L Y E L D A I R K A C A S L E P
aactatcaaccacctgtcacgtttgttgtggttcaaaaacgccatcacactaggttgtt
N Y Q P P V T F V V V Q K R H H T R L F
gcaataaaccatcatgaccgtaatgcagttgataagagtggaaacatattgcctgggtact
A N N H H D R N A V D K S G N I L P G T
gtttagactctaagatttgtcacccaactgaatttgatttctatctttgttctcatgct
V V D S K I C H P T E F D F Y L C S H A
ggaattcagggtacaagtcgtccagctcattatcatgtcctctgggatgagaacaagttt
G I Q G T S R P A H Y H V L W D E N K F
acagctgatgggtgcagtcoccttacaataatctttgctacacatatgcaagggtgtaca
T A D G L Q S L T N N L C Y T Y A R C T
cgttctgtttctattgtgccccctgcgtactatgcccatcttgcgtgctttccgagctcgt
R S V S I V P P A Y Y A H L A A F R A R
ttctatatggagccagagacgtcagatagtggttcaatgacaagtggtgctgctgctggt
F Y M E P E T S D S G S M T S G A A A G
ggcatgggaggagggtccacgaagcaccgctccaccaggtgctaagtgctgctgtgaga
G M G G G P R S T R P P G A N A A V R
ccctacctgcacttaagagaatgttaagagggttatgttttactgttagctagctgg
P L P A L K E N V K R V M F Y C
ttcctaatacctacttcttagtggaagattaactaatgctttatattaaacttatctatgt
gaaagtttg

```

Figura 12.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc de *CsAGO1*. Se indican en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG). En la secuencia aminoacídica se muestran los dominios PAZ (violeta) y PIWI (azul). Los aminoácidos de la tétrada catalítica están sombreados en amarillo.

Las tres secuencias contienen las regiones conservadas típicas PAZ y PIWI que fueron identificadas mediante búsqueda de homología en la base de datos pfam (<http://pfam.xfam.org/>). El dominio PAZ de *CsAGO1* tiene 129 aminoácidos (residuos 332-460) y comparte

aproximadamente del 84% al 97% de homología con el de proteínas AGO1 en otras especies vegetales (Figura 12). El dominio PAZ de CsAGO4 comprende 128 aminoácidos (del residuo 298-428) y comparte del 83 al 63% de homología con otros miembros AGO4 en otras plantas (Figura 13). El dominio C-terminal PIWI de CsAGO1 consta de 322 aminoácidos (residuos 619-940, Figura 12), y tiene una gran similitud con dicho dominio de otros miembros AGO1, por ejemplo con el de AGO1 de *C. sinensis* (98%), de *V. vinifera* (98%), de *P. mume* (98%) o de *R. communis* (98%) entre otras. El dominio PIWI de CsAGO4 de 309 aminoácidos (residuos 581-889, Figura 13) comparte entre el 93-94% de homología con los de AGO4 de *V. vinifera*, *E. grandis* y *P. trichocarpa*. Las secuencias parciales de los dominios PAZ y PIWI de la proteína CsAGO5 también fueron localizadas (Figura 14). Generalmente el dominio PIWI muestra un mayor grado de similitud entre los miembros de AGOs vegetales, como ya se vio anteriormente en un estudio en el que se observaba una mayor conservación del dominio PIWI que del dominio PAZ (Carmell *et al.*, 2002).

tg

```

aaaagccggtttggttttagccttttaagggttatggtgattcatttgagccagatggtaatgga
                                M D S F E P D G N G
gtagcaaatgggaatggagcaacaaatgggaatggagcacaggaagcattgcctcctcct
V A N G N G A T N G N G A Q E A L P P P
ccccctgttattcctccaaatgttggtccagtcggtgcagaaggagaccaacctcctgaa
P P V I P P N V V P V R A E G D Q P P E
ccagttaagaaaaagggttatgagagtcctccatagctaggcgtggtccttgcaaacaaagga
P V K K K V M R V P I A R R G L A N K G
cagaagatacaactgcttactaatcacttcaaagttgggggtcaataatggtgatggccat
Q K I Q L L T N H F K V G V N N V D G H
ttcttccattatagtggtttctttggcctacgaagatgggtcgccctggtgatggtaaagg
F F H Y S V S L A Y E D G R P V D G K G
gttggaagaaagggtgattgatagggtgcaggagacttatgatactgagtttagctggaaa
V G R K V I D R V Q E T Y D T E L A G K
gactttgcttatgatggggagaagagtcgtgtcactgttggtccacttccccgcaacaag
D F A Y D G E K S L F T V G P L P R N K
cttgagtttactgttgactcgaggatgtcatatcaaacagaaataatggaaacagtagc
L E F T V V L E D V I S N R N N G N S S
cctaattggtcacggaagtccaatgaggggtgatcgaaagaggatgcggcggtccatcatcag
P N G H G S P N E G D R K R M R R P Y Q
tcgaagacattcaaagtggagattagctttgctgcaaaaattcccatgcaagccattgca
S K T F K V E I S F A A K I P M Q A I A
aatgcactaaggggtcaagaatcagagaactcacaagaagcccttagagtgttgatatt
N A L R G Q E S E N S Q E A L R V L D I
atattgagggcagcatgctggctaaacagggctgcctgcttggtcgtaactctttctttcac
I L R Q H A A K Q G C L L V R Q S F F H
aatgatccaaaaaattttgcagatgttgagggtggtgttcttggtgcagaggatttcat
N D P K N F A D V G G G V L G C R G F H
tcaagttttagaacctcccagggtggattatctctgaatattgatgtatcaactaccatg
S S F R T S Q G G L S L N I D V S T T M
attatacagcctggaccggtggtggtgatttcttaattgcccaaccagaatgtgagagatcct
I I Q P G P V V D F L I A A N Q N V R D P
ttctcacttgattgggtcaaaggctaaacgaacgctcaaaaatctgaggattaagacgagt
F S L D W S K A K R T L K N L R I K T S
cctgcaatcaagagttcaagataactggattgagtgagaagacatgcaaagatcaaatg
P A N Q E F K I T G L S E K T C K D Q M

```


ttacactgaagcagagaggaaatgacgcagatggtgaacctcagacgatagaagtgact
 F T L K Q R G N D A D G E P Q T I E V T
 gtctatgattatTTTTgttaatcatcggtgatatagaattgcgttattctggagatctgccaa
 V Y D Y F V N H R G I E L R Y S G D L P
 tgtattaatgtttggaaagccaaagcgcccaactttcttccctcttgagctttgttcattg
 C I N V G K P K R P T F F P L E L C S L
 gtgtccttgcaacgtttacacaaaagctttatccactcttcaaagagcttcactagtggaa
 V S L Q R Y T K A L S T L Q R A S L V E
 aaatcaaggcaaaagccacaagagaggatgaagggtttgtctgaggctttgaaatgtaac
 K S R Q K P Q E R M K V L S E A L K C N
 aattatgattctgaacctttgctacgatcatgtggcatttcaatcagtaccagcttcact
 N Y D S E P L L R S C G I S I S T S F T
 caagttgatggcgtgttctgccagctccaagggttgaaagtgggcaatggagaggatttc
 Q V D G R V L P A P R L K V G N G E D F
 tttcctaggaatggtcgatggaatttcaacaataagaaattagtgcagccaacaaagatt
 F P R N G R W N F N N K K L V Q P T K I
 gagcgctgggctgtagtgaacttctcagcgctgtgtgatacacaagcttctgtacgggat
 E R W A V V N F S A R C D T Q S L V R D
 ctaattaaatgtggagatctgaaaggaattcaaatagatgtccattcgatgtgtttcaa
 L I K C G D L K G I Q I D A P F D V F Q
 gaaaatcctcagaatagacgcgtccacccatggctagagtggagaagatgtttgaggat
 E N P Q N R R A P P M A R V E K M F E D
 attcaatcaaaacttctgtgtgtccacagtttcttctatgcttgccttctcctgagagaaaa
 I Q S K L P G A P Q F L L C L L P E R K
 aactccgatctttatggtccatggaagcgaaagaatcttgcgtgagtatggaatagtcact
 N S D L Y G P W K R K N L A E Y G I V T
 cagtgcattgtcctactaggggttaatgaccaatatcttaccatgttcttttgaagatc
 Q C I A P T R V N D Q Y L T N V L K I
 aatgcaaagatgggtggtttgaattcattactagctgttgaaactctccttcaatccca
 N A K M G G L N S L L A V E H S P S I P
 ttggtttccaaggctccaccatcatacttgggatggatgtgtctcatggctctcctggg
 L V S K A P T I I L G M D V S H G S P G
 cagtctgatgtaccatcaattgctgcggtggtcagctcaaggcagtgccattgatttct
 Q S D V P S I A A V V S S R Q W P L I S
 aaatatagggcatctgttcggacacaatcccaaagggttgaaatgatagattctttattt
 K Y R A S V R T Q S P K V E M I D S L F
 aagaaaacatctgaaactgaagatgacggcataatgagggagcttctgctggacttctat
 K K T S E T E D D G I M R E L L L D F Y
 acaagttcagggaaaagaaaaccagatcagattatcatattcagggatggagtcagtgaa
 T S S G K R K P D Q I I I F R D G V S E
 tcacaattcaatcaagtgttgaaacttgaaactggatcaaatcattgagtcctgcaagttt
 S Q F N Q V L N I E L D Q I I E S C K F
 ctcgatgagaagtggaaaccaaagtttgtggttaattgttgacagaaaaaccatcataca
 L D E K W N P K F V I V A Q K N H H T
 aaattcttccagcctggatctcctgataatgttccacctggaactgttatagataacaaa
 K F F Q P G S P D N V P P G T V I D N K
 gtttgtcatccacgaacaatgatttctacctatgtgacatgctggaatgatttggtacc
 V C H P R N N D F Y L C A H A G M I G T
 acaaggcctacacattaccatgttcttttagatgacggttggtttttcagcagatgatcta
 T R P T H Y H V L L D D V G F S A D D L
 caggaacttgtgcattccctgtcatatgtgtaccagagaagcaccactgccatttctgta
 Q E L V H S L S Y V Y Q R S T T A I S V
 gttgctcctatatgttatgcacacttggcagccacccaaatgggtcagttcatgaaattt
 V A P I C Y A H L A A T Q M G Q F M K F
 gaggagttatctgagacatcctcaagccatggtggagtgacttctgctggagctgttctc
 E E L S E T S S S H G G V T S A G A V P
 gtcccacaacttcccagattgcaggagaacgtgtgcaactcgatgttcttttgttgagag
 V P Q L P R L Q E N V C N S M F F C
 gcgtgtaccctctgcctatatgaaacatgacagtagtattatgaacacatggtctgtata
 tagccgtagtttctggtgtggcctccctgg

Figura 13.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc de *CsAGO4*. Se indican en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG). En la secuencia aminoacídica se muestran los dominios PAZ (violeta) y PIWI (azul). Los aminoácidos de la tétada catalítica están sombreados en amarillo y las regiones únicas de los miembros del grupo AGO4 subrayadas.

El análisis de secuencia aminoacídica de *CsAGO1* con el programa ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) mostró la presencia de una región rica en glicina (4-46), 25 sitios de N-miristoilación, 7 sitios fosforilación para caseína quinasa II, 18 sitios de fosforilación para la proteína quinasa C, 3 sitios de amidación, 2 sitios de fosforilación para la tirosina quinasa, 2 sitios de N-glicosilación y un sitio de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP. El análisis de *CsAGO4* reveló la presencia de 16 sitios de N-miristoilación, 2 sitios de amidación, 14 sitios de fosforilación para la proteína quinasa C y 10 para la caseína quinasa II, un sitio de fosforilación de la tirosina quinasa, 3 para la proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP y uno de N-glicosilación. En el fragmento de la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína *CsAGO5* también se encontraron varios sitios de fosforilación, de amidación, de N-miristoilación y de N-glicosilación. Además, las tres secuencias contienen un dominio DUF1785 de función desconocida identificado por CD search a través de blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2005) y por SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Como se muestra en la Figura 13, se identificaron regiones únicas de los miembros del grupo AGO4. Estas secuencias están localizadas en dos tercios del extremo N-terminal de la molécula e incluyen los motivos: TNHFKV–HFFHYSV–DGRPV localizados del aminoácido 76 a 106; PGPVVDLIANQN localizado del 294 al 306; DLPCINVGKPKR localizado de 388 a 399; NGRWNFNKNK localizado de 494 a 502 y RRAPP–QSKLPG localizado de 556 a 577.

```

                                gccagttaatgtttacccttgatgacaagaaa
                                M F T L D D K K
acaaagacatcagttcttcaatatatttcgtgacaaatataacattgttctccagtatgcg
T K T S V L Q Y F R D K Y N I V L Q Y A
tttttgctgccccttcaagctggttagtgattcaaaaccagtttacttaccgatggaggtc
F L P A L Q A G S D S K P V Y L P M E V
tgtgtgattgctgctggacagagatacactaagagattaaatgaaaaacaagtaactaac
C V I A A G Q R Y T K R L N E K Q V T N
ctattaagagcaacgtgtcaacggccanttgacaggnnanggagtatcacagggatnnta
L L R A T C Q R P X D R X X S I T G X X
aagcataatgattttagnagagttaagcttgtagtgagganttnngaattnaagtacga
K H N D F X R V K L V R E X X G I X V R
gaaggacttacaacagttgatgctcgagtggttgccgtctccaatgctgaattatcgaa
E G L T T V D A R V L P S P M L N Y H E
actgggagagaatcaagggaacatcctaggatggggcaatggaatatgataaacaagaaa
T G R E S R E H P R M G Q W N M I N K K
atggtcaacggtggttagagtgtcatattggacgtgtgtgaatttcttactcggtgaac
M V N G G R V S Y W T C V N F S T R V N

```

```

agagattttccgttccaattctgtgagaaattgggtcaacatgtgcaacagcaaaggaatt
R D F P F Q F C E K L V N M C N S K G I
gattttttaccgagacccttttgataccaatacattcagctcatgctggtcaaattgatagg
D F Y R D P L I P I H S A H A G Q I D R
gctctcatggatattcacaagcaatgtgcagccaaacttaaagaaattgagccaggaaaa
A L M D I H K Q C A A K L K E I E P G K
cagcttcagctgttgataattatgttgcctgatgctactgggtcatatgggaagattaaa
Q L Q L L I I I I L P D A T G S Y G K I K
cgtatatgtgaaacggagctaggaattgtttctcagtgctgtcagcccaagcaagcaaca
R I C E T E L G I V S Q C C Q P K Q A T
aaacttagtatgcagtacctggaaaatttggtctcaagatcaatgtgaaggctgggga
K L S M Q Y L E N L A L K I N V K A G G
cgtaacaatgtgttaactgatgctattcaaaaaagaattcctcttgtatctgatcgccct
R N N V L T D A I Q K R I P L V S D R P
acaattatattttgggtgaggatgtgacacatccacaaccgggagaggactctagcccttca
T I I F G A D V T H P Q P G E D S S P S
atagcagcggtagtggcttctatggattggccggaggtaaccaaa
I A A V V A S M D W P E V T K

```

Figura 14.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) de la secuencia parcial de ADNc de *CsAGO5*. En la secuencia aminoacídica se muestran el fragmento del dominio PAZ (violeta) y PIWI (azul). El único aminoácido de la tétada catalítica presente está sombreado en amarillo.

El alineamiento de los dominios PIWI de AGOs vegetales, incluyendo CsAGOs y sus parálogos en *Arabidopsis*, permitió detectar la presencia de la tétada catalítica (DEDH/D) en las proteínas AGOs de castaño (Figura 15, flechas). En CsAGO1 se localizó también la histidina conservada, esencial para la actividad endonucleasa. Sin embargo, en CsAGO4, así como en AtAGO6 y AtAGO8 la histidina en posición 798 estaba reemplazada por una prolina (P), mientras que en AtAGO4 ese sitio fue cambiado a serina (S) y en AtAGO9 por arginina (R). En el alineamiento se localizaron también los dominios estructurales característicos de las proteínas AGO: N, L1, PAZ, L2, MID y PIWI (Figura 15).

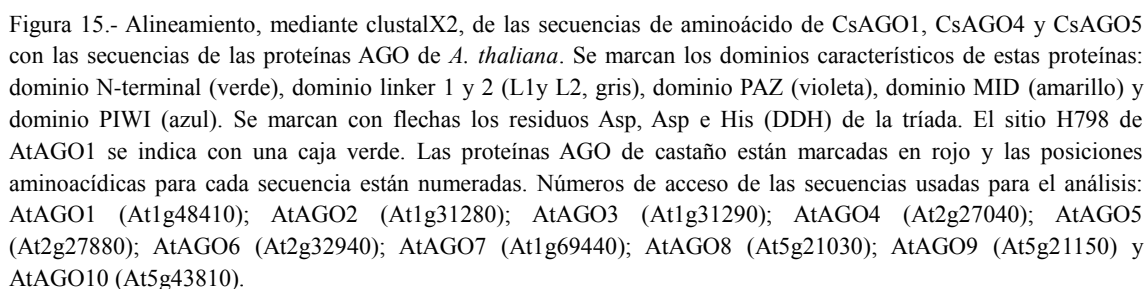
```

AtAGO1    TYQA--VSSQPTLS--EVSEPTQVPEPTVLAQQFEQLSVEQG-APSQAIQPIPSSSKAFKFPMPKQ-- 187
CsAGO1    PHQPGVIPPQSTLPSEASSSSQPPESQVVSFNLTIEEVSGPAQPIQVPPSSKSVRFPLRPGKGS-- 129
AtAGO10   SDQGDVCMRPSSRP-----RKPPPSQTTSSAVSVATAGEIVAVNHQMOMG--VRKNSNFAPRPGECT-- 136
AtAGO5    GDPTFSVASSSKTVSVASSSKEESKNTETVSETMSNLQITSTETKPEMTSLPPASSKAVTFVVRPGCT-- 155
CsAGO5    ----- 136
AtAGO8    DTT-----LPPFQ-----HMER-----PLKSKSSLPMTR-RGNCS-- 32
AtAGO9    DSDEFNGS-----GLPPPPFVFPANLVPEVE-----PVK-KNILLPMARPRGSGS-- 45
AtAGO4    DSTNGNGADLESANGAN-GSGVTEALPPPPVIPPVNPVPRVKTELAE---KKGPVRVPMAR-KGECT-- 64
CsAGO4    DSFEPDGNGVANGNGATNGAQEALPPPPVIPPVNPVPRVAEGDQPPPEPVKKKVMRPVIAR-RGLAN-- 68
AtAGO6    ETSS-----SLPLSPISIEPEQPSHRD-----YDITTRRGVCT-- 34
AtAGO2    VGGVAGRGAWGRKPQVPSDS---ASPSTSTTVVSEPVVRVAEVMNLKPSVQVATSDRKEPMK-RPDRGGVV 171
AtAGO3    TGGVG-LGAWARKQLFSDSTVLPSSSSSNVVASHTASGSQVMTPKP----SSSDKKEPVK-RPDKGGNI 343
AtAGO7    LPPLLPLPPPHSMTRFHKSLP--VSQVVERKQHQKQKKIQVSNKVSGSIAIEEAALVVAKRPDEGG-- 158
Clustal C . 1

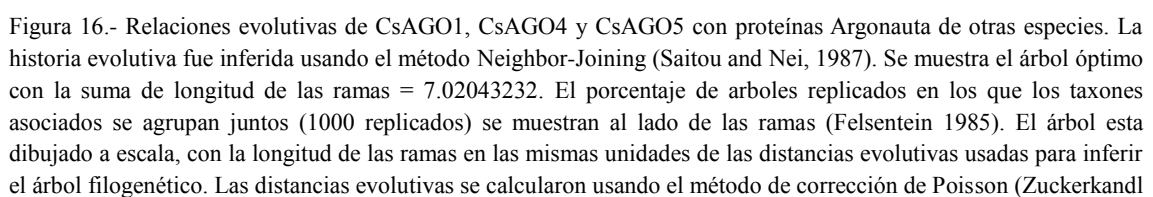
```

73

[illegible]



Para definir las relaciones evolutivas de CsAGOs con AGOs de otras especies, se realizó un análisis filogenético, por una parte con las proteínas AGO de *A. thaliana*, y de *O. sativa* (Figura 16) y por otra parte con un mayor número de secuencias vegetales (Figura 17). En ambos análisis se identificaron tres clados. CsAGO1 y CsAGO5 se agruparon en el clado que contiene a AtAGO1 y AtAGO5 (Clado I) y CsAGO4 se agrupó en el clado que contiene AtAGO4 (Clado III) (Figura 16). El genoma de *O. sativa* codifica más miembros de la familia AGO que *Arabidopsis* sin embargo, observamos la misma distribución en tres clados en nuestro análisis filogenético (Figura 16).



and Pauling 1965) y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis implicó 33 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían huecos se eliminaron. Hubo un total de 527 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo con el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2015). Números de acceso de secuencias usadas para el análisis: AtAGO1 At1g48410; AtAGO2 At1g31280; AtAGO3 At1g31290; AtAGO4 At2g27040; AtAGO5 At2g27880; AtAGO6 At2g32940; AtAGO7 At1g69440; AtAGO8 At5g21030; AtAGO9 At5g21150; AtAGO10 At5g43810; OsAGO1A LOC_Os02g45070.1; OsAGO1B LOC_Os04g47870.1; OsAGO1C LOC_Os02g58490.1; OsAGO1D LOC_Os06g51310.2; OsAGO2 LOC_Os04g52540.1; OsAGO3 LOC_Os04g52550.1; OsAGO4A LOC_Os01g16870.3; OsAGO4B LOC_Os04g06770.2; OsAGO7 LOC_Os03g33650.1; OsAGO11 LOC_Os03g47830.1; OsAGO12 LOC_Os03g47820.1; OsAGO13 LOC_Os03g57560.1; OsAGO14 LOC_Os07g09020.1; OsAGO15 Os01g0275200; OsAGO16 Os07g0265600; OsAGO17 LOC_Os02g07310.1; OsAGO18 LOC_Os07g28850.1; OsAGO5C LOC_Os03g58600.1; OsAGO10 LOC_Os06g39640.1 y DmAGO1 (NP_523734.1)

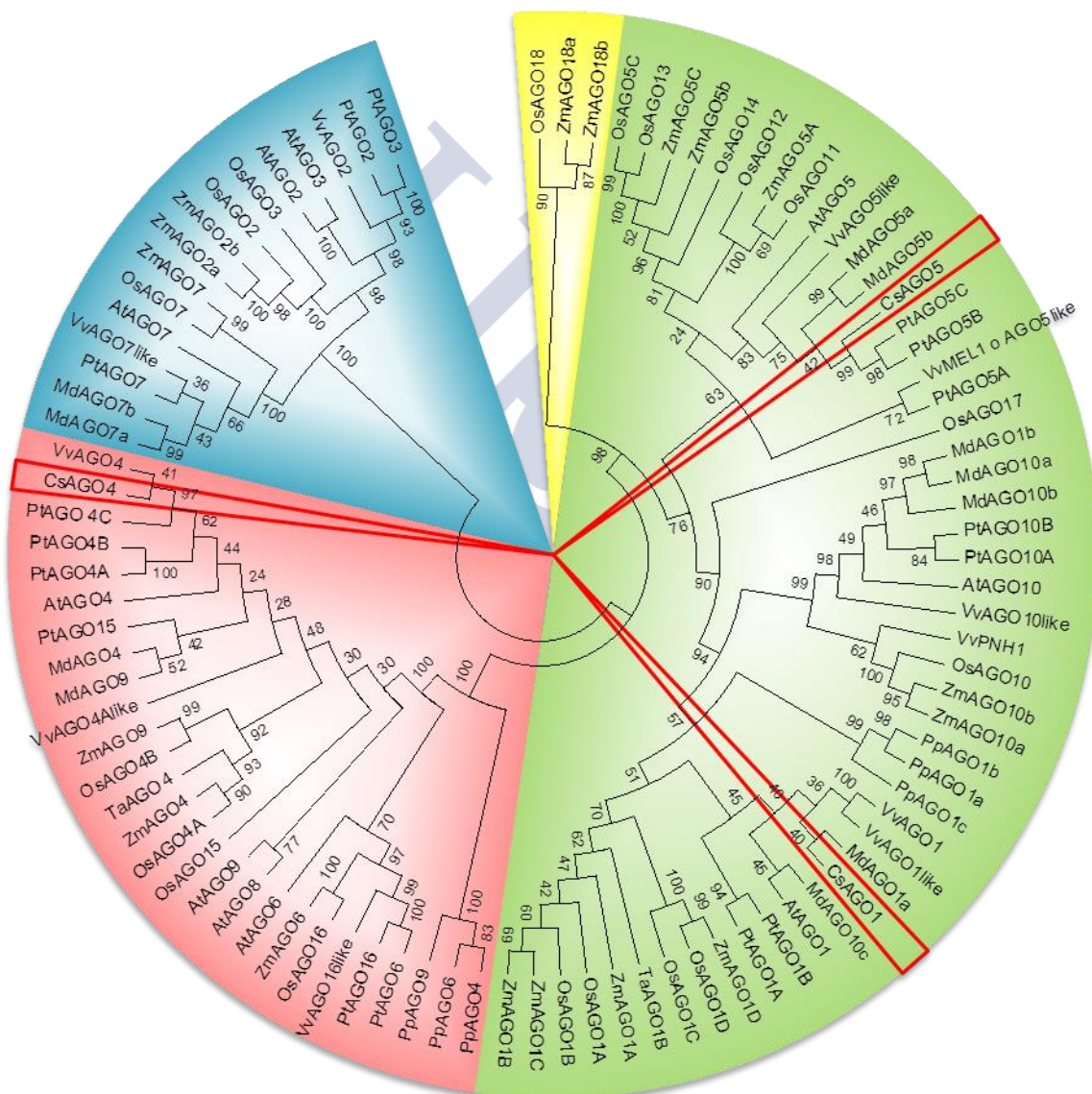


Figura 17.- Relaciones evolutivas de CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5 con proteínas ArgonAUTa de otras especies. La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) con 1000 replicados de bootstrap. Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de las ramas = 15.42439336. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de corrección de Poisson (Zuckerandl and Pauling 1965) y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis implicó 95 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían huecos se eliminaron. Hubo un total de 196 posiciones en el conjunto de datos final. Los

análisis evolutivos se llevaron a cabo con el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2015). Números de acceso de secuencias usadas para el análisis: AtAGO1 At1g48410; AtAGO2 At1g31280; AtAGO3 At1g31290; AtAGO4 At2g27040; AtAGO5 At2g27880; AtAGO6 At2g32940; AtAGO7 At1g69440; AtAGO8 At5g21030; AtAGO9 At5g21150; AtAGO10 At5g43810; OsAGO1A LOC_Os02g45070.1; OsAGO1B LOC_Os04g47870.1; OsAGO1C LOC_Os02g58490.1; OsAGO1D LOC_Os06g51310.2; OsAGO2 LOC_Os04g52540.1; OsAGO3 LOC_Os04g52550.1; OsAGO4A LOC_Os01g16870.3; OsAGO4B LOC_Os04g06770.2; OsAGO7 LOC_Os03g33650.1; OsAGO11 LOC_Os03g47830.1; OsAGO12 LOC_Os03g47820.1; OsAGO13 LOC_Os03g57560.1; OsAGO14 LOC_Os07g09020.1; OsAGO15 Os01g0275200; OsAGO16 Os07g0265600; OsAGO17 LOC_Os02g07310.1; OsAGO18 LOC_Os07g28850.1; OsAGO5C LOC_Os03g58600.1; OsAGO10 LOC_Os06g39640.1; MdAGO10c MDP0000161046; MdAGO7a MDP0000118779; MdAGO9 MDP0000215105; MdAGO10a MDP0000071268; MdAGO7b MDP0000159246; MdAGO1a MDP0000069525; MdAGO4 MDP0000209079; MdAGO5b MDP0000774227; MdAGO5a MDP0000232035; MdAGO1b MDP0000199819; MdAGO10b MDP0000191579; PtAGO2 Potri.012G118700.1; PtAGO3 Potri.015G117400.1; PtAGO5A Potri.006G118600.1; PtAGO5B Potri.009G001500.1; PtAGO5C Potri.001G213700.1; PtAGO4A Potri.006G025900.1; PtAGO4B Potri.016G024200.1; PtAGO 4C Potri.001G219700.1; PtAGO10A Potri.008G158800.1; PtAGO10B Potri.010G081300.1; PtAGO1A Potri.012G037100.1; PtAGO1B Potri.015G029000.1; PtAGO6 (EEE98804.2); PtAGO15 Potri.008G010500.1; PtAGO16 Potri.014G159400.1; PtAGO7 Potri.010G163800.1; VvAGO10like (XP_002279408.1); VvAGO4 (XP_002275928.1); VvPNH1 (XP_002281687.1); VvAGO7like (XP_002267746.1); VvAGO4Alike (XP_002264978.1); VvAGO1like (XP_002271225.1); VvAGO5like (XP_010651834.1); VvAGO5like (XP_010654011.1); VvAGO2 (XP_010655928.1); VvAGO16like (XP_010657243.1); VvAGO1 (XP_002271225.1); ZmAGO1A (A0A096TTL7) GRMZM2G441583; ZmAGO1B (K7U605) AC209206.3_FG011; ZmAGO1C (A0A096QEV4) GRMZM2G039455; ZmAGO1D (A0A096TEK0) GRMZM2G361518; ZmAGO5C GRMZM2G123063; ZmAGO5A GRMZM2G461936; ZmAGO2a GRMZM2G007791; ZmAGO18a GRMZM2G105250; ZmAGO5b GRMZM2G059033; ZmAGO10a AC189879.3_FG003; ZmAGO7 GRMZM5G892991; ZmAGO18b GRMZM2G457370; ZmAGO4 GRMZM2G589579; ZmAGO6 GRMZM2G347402; ZmAGO10b GRMZM2G079080; ZmAGO9 GRMZM2G141818; ZmAGO2b GRMZM2G354867; TaAGO1B (JQ805149); TaAGO 4 (JQ805150); PpAGO1a Pp3c1_35770; PpAGO1b Phypa_158832; PpAGO1c Phypa_141045; PpAGO4 Phypa_200513; PpAGO6 Pp3c18_9600; PpAGO9 Phypa_134255

Los análisis filogenéticos de las proteínas AGO vegetales, incluyendo las de castaño, arroz, *Arabidopsis*, trigo, maíz, vid, chopo y manzano mostraron que CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5 pueden ser clasificadas en dos de los tres grupos descritos previamente. CsAGO1 y CsAGO5 se asignaron al grupo I, y CsAGO4 como parte del grupo III, pertenece a la misma subclase monofilética que otras proteínas AGO4, 6, 8 y 9. En este último análisis filogenético con más especies vegetales se observa que maíz y arroz han evolucionado un subclado AGO18 que cae dentro del clado AGO I (Figura 17).

4.2.3 Modelado estructural de las proteínas CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5

El modelado estructural de las proteínas CsAGO se realizó usando como molde la proteína AGO2 humana (PDB: 4ola). En las estructuras modeladas de las proteínas de castaño se localizaron los dominios N-terminal, PAZ, MID y PIWI, así como los dominios linker 1 (L1) y linker 2 (L2) (Figura 18 A, B y C). La estructura es una molécula bilobulada con una hendidura central donde se acoplan los ARNs guía y diana. El dominio N-terminal y dominio PAZ se unen a través de la región L1. El segundo linker de las proteínas AGO eucariotas es L2, que junto con los dominios N, PAZ y L1 forman un plegamiento global compacto. Los dominios N, MID y PIWI forman una base sobre la que se asienta el dominio PAZ (Figura 18 A, B y C). En la modelización se incluyó en el interior de las proteínas AGO un sARN guía de 21 nt poli-

adenosina. Este sARN parece unirse en el dominio PAZ por el extremo 3' y en la región MID-PIWI por el extremo 5' (Figura 8 A, B y C). Los cuatro residuos de la tétrada catalítica (DEDH) están espacialmente próximos unos a otros y localizados en el sitio “slicer” del dominio PIWI (Figura 18 D).

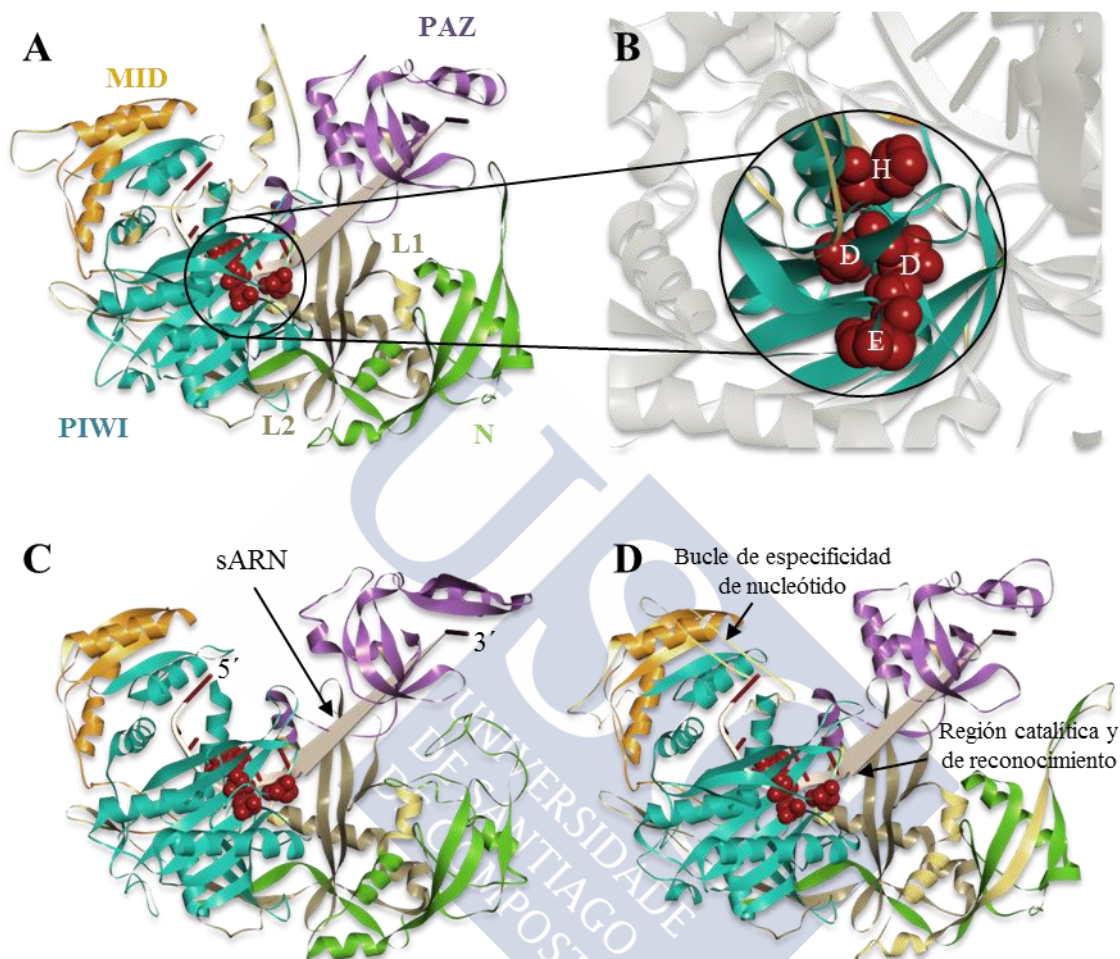


Figura 18.- Modelado de la estructura de las proteínas CsAGO1 (A y B), CsAGO4 (C) y CsAGO5 (D). Se muestran las características estructurales de las proteínas Argonauta: el dominio PAZ (violeta) está situado cerca del extremo N terminal de la proteína (verde). El dominio PIWI (azul) contiene los residuos catalíticos DEDH (en rojo), que son esenciales para la escisión. El dominio MID se colorea en naranja, los dominios N-terminal en verde, y las regiones L1 y L2 en gris. Se modeló un sARN guía en el interior de cada proteína. En B se muestra un aumento de la tétrada catalítica del dominio PIWI de CsAGO1 (A) donde se puede observar la proximidad estructural de los residuos.

4.3 Discusión

La regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional juega un papel crítico en el desarrollo de plantas. Las vías ARNi están implicadas en silenciamiento génico post-transcripcional y modificaciones de la cromatina. Las proteínas Argonauta comprenden una familia altamente conservada cuyos miembros han sido implicados en vías de silenciamiento por ARN (Carmell *et al.*, 2002). En este trabajo se aislaron los ADNc completos de dos genes

AGO de castaño, *CsAGO1*, *CsAGO4* y la secuencia parcial de *CsAGO5*. Las proteínas codificadas por estas secuencias son básicas (pI~9) con pesos moleculares predichos de ~100 kDa, similar a otros miembros AGO de eucariotas (Song *et al.*, 2004; Tolia y Joshua-Tor, 2007) y contienen dominios característicos de las proteínas AGO. Por lo tanto, las tres secuencias identificadas en castaño son genes de la familia AGO y potencialmente poseen también sus funciones reguladoras de la expresión génica.

El análisis de las secuencias de aminoácidos mostró que poseen los dominios característicos PAZ y PIWI de las proteínas AGO. Estos dominios altamente conservados tienen importantes papeles durante el proceso de regulación génica mediada por ARNi (Vaucheret, 2008). El dominio PAZ es una región clave que interactúa con el extremo 3' de los sARNs y determina la especificidad de unión a ARN de las AGOs. El dominio PIWI se une a extremo 5' y también interactúa con el ARN diana (Hutvagner y Simard, 2008). Algunas proteínas AGO escinden el ARN diana complementario al sARN (Baumberger y Baulcombe, 2005). Durante este proceso de escisión, tres residuos conservados en el dominio PIWI desempeñan papeles críticos y funcionan como tríada catalítica (Parker *et al.*, 2005; Kapoor *et al.*, 2008). Además, las proteínas PIWI con motivos catalíticos activos degenerados "D-D-H/D/E/K" muestran actividad "slicer" reducida (Tolia y Joshua-Tor, 2007). Esta tríada DDH, presente en los dominios PIWI de las tres proteínas AGO de castaño que hemos caracterizado en este trabajo (*CsAGO1*, *CsAGO4* y *CsAGO5*) está conservada, así como lo están las regiones que rodean a los tres residuos que son parte del sitio activo en las proteínas AGO, lo cual indica que pueden llevar a cabo la actividad de escisión. Además, las tres proteínas poseen un cuarto aminoácido, un glutamato, completando la tétrada DEDH del sitio activo. La presencia de un cuarto residuo catalítico fue identificada y confirmada en KpAGO (Nowotny *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2012). Además, *CsAGO1* y *CsAGO5* poseen una histidina conservada en la posición 798 (H798), la cual en *AtAGO1* se ha demostrado que es esencial para la actividad endonucleasa (Baumberger y Baulcombe, 2005). Estos datos sugieren, que al menos las proteínas *CsAGO1* y *CsAGO5* poseen actividad de escisión de ARN como sus homólogos más próximos de *Arabidopsis* (Rivas *et al.*, 2005) y que son funcionalmente similares en silenciamiento génico dirigido por ARN a AGOs previamente caracterizadas. En *CsAGO4* la histidina en posición 798 está reemplazada por una prolina, por lo que no podemos descartar ni afirmar la posibilidad de dicha función endonucleasa.

El alineamiento múltiple permitió la identificación de los dominios conservados de las proteínas AGO, así como de las secuencias características de dicotiledóneas únicas de la familia AGO4, localizadas dentro de los dos tercios del extremo N-terminal de la molécula. Es posible que estas secuencias jueguen un papel en las funciones específicas de AGO4, posiblemente permitiendo

que se unan a los complejos DICER de manera diferente a aquellas que se asocian con otras proteínas AGO como fue propuesta en el caso de AGO1 de *A. thaliana* (Baumberger y Baulcombe, 2005). De manera alternativa, las secuencias pueden indicar sitios de interacción con la maquinaria de silenciamiento génico transcripcional, una función que otras proteínas AGO no poseen.

El análisis filogenético confirmó la presencia de tres clados para las proteínas AGO, como originalmente fue propuesto para las de *A. thaliana* (Vaucheret, 2008). Las proteínas CsAGO1 y CsAGO5 se agrupan en el Clado I, estando CsAGO1 relacionada más próximamente con MdAGO1 y en el caso CsAGO5 más próxima con PtAGO5A y PtAGO5B. El clado I fue definido originalmente por contener AGO1, 5 y 10. El genoma de *O. sativa* contiene más copias de genes de AGO1 y AGO5 que *Arabidopsis* posiblemente debido a un proceso de amplificación y diversificación de este clado en arroz. El Clado II contiene los AGO2, 3 y 7 de *Arabidopsis*. Este clado es único, ya que algunos miembros tienen distintos aminoácidos del sitio activo predicho (Nowotny *et al.*, 2005). La proteína CsAGO4 se agrupa en el clado III que incluye AGO4, 6, 8 y 9 de *Arabidopsis* estando relacionada más próximamente con VvAGO4. Los AGO6s forman un linaje distinto pero aún están más relacionados con los otros miembros del Clado III que con otros clados.

Las proteínas CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5 han sido modeladas usando como molde la proteína AGO2 humana. En las tres se pueden apreciar los dominios N-terminal, PAZ, MID y PIWI, así como los dominios L1 y L2 característicos de las proteínas AGO, respondiendo al modelo esperado y siendo las tres similares entre sí. Hasta la fecha no hay estructuras cristalinas disponibles de AGOs vegetales enteras. Sin embargo, dado que todas las estructuras de AGO eucariotas resueltas son altamente similares, y las estructuras cristalinas de los dominios MID de AtAGO se asemejan a aquellas de AGO2 humano (Frank *et al.*, 2010, 2012), parece razonable basar nuestra comprensión de las estructuras de AGO vegetales en estructuras resueltas de otras AGOs eucariotas. Por otra parte, los análisis intensivos de mutantes *ago* de *Arabidopsis* también han proporcionado información importante sobre las estructuras y funciones de AGOs de plantas (Poulsen *et al.*, 2013). Al principio solo se habían resuelto las estructuras de los dominios PAZ, MID y MID-PIWI aislados de varias AGOs eucariotas (Lingel *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004; Boland *et al.*, 2010, 2011; Frank *et al.*, 2010). Posteriormente se determinaron las primeras estructuras de AGOs eucariotas completas: hAGO2, KpAGO de *Kluyveromyces polysporus* formando complejo con una mezcla de ARN heterogéneo, hAGO2 en complejo con miR-20 y hAGO1 (Elkayam *et al.*, 2012; Nakanishi *et al.*, 2012, 2013; Schirle y MacRae, 2012; Faehnle *et al.*, 2013; Kuhn y Joshua-Tor, 2013; Schirle *et al.*, 2014, 2015). En la modelización de las proteínas AGO de castaño se

incluyó también un sARN guía y su posición dentro de las mismas es consistente con el hecho de que la interfaz MID-PIWI tiene un sitio de unión para el fosfato 5' de los sARNs (Frank *et al.*, 2010, 2012) y que el dominio PAZ tenga un sitio de unión específico del extremo 3' del sARN (Lingel *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005; Elkayam *et al.*, 2012). La presencia de la tétrada catalítica DEDH en CsAGO1, CsAGO4 y CsAGO5, sugiere que estas proteínas tengan actividad slicer. Por otra parte, la distribución espacial de los residuos DEDH, muy próximos entre ellos en las tres proteínas de castaño, y localizados en el sitio “slicer” de los dominios PIWI, también apunta a que estas proteínas tengan actividad endonucleotídica. Sin embargo, cabe señalar que aunque todas las AGO humanas funcionan en la vía de microARN y se asocian con un repertorio similar de ARN y cofactores proteicos para llevar a cabo el silenciamiento génico, solo hAGO2 es un “slicer” activo y escinde el ARNm diana (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004). Los homólogos restantes (hAGO1, hAGO3 y hAGO4) facilitan la represión traduccional aunque hAGO3 tiene una tétrada catalítica intacta, por lo que parece que los determinantes esenciales para la actividad “slicer” no están únicamente localizados sitio activo. Estas características demuestran el funcionamiento regulatorio de las AGOs de castaño dentro de la maquinaria de ARNi.

La filogenia y los dominios conservados de las proteínas CsAGOs sugieren que los genes de castaño podrían compartir funciones similares a sus homólogos de otras especies vegetales. En plantas, las vías dependientes de ARNi han sido implicadas en el control de la expresión génica y en varios eventos de desarrollo (Hamilton y Baulcombe, 1999; Chen, 2004). Los componentes de la maquinaria ARNi participan en el mantenimiento de las células no diferenciadas en el MAB, en la iniciación de los primordios de los órganos laterales del SAM y meristemos florales, y en la formación de las células germinales masculinas y femeninas (Liu *et al.*, 2005; Nagasaki *et al.*, 2007; Nonomura *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, AGO1 y AGO10 regula el programa temporal de las CM a través de dos miARNs, miR172 y miR165/166 (Ji *et al.*, 2011). En arroz, los perfiles de expresión han mostrado que los homólogos de AtAGO1 y AtAGO4 se estimulan significativamente en el inicio del desarrollo floral (Kapoor *et al.*, 2008).

Los genes CsAGOs han sido aislados a partir de embriones somáticos de castaño. Además de la implicación de las proteínas AGO en los mecanismos de silenciamiento por ARN, varios miembros de la familia AGO también regulan la identidad de las CM y el destino celular en varios organismos (Carmell *et al.*, 2002). En *Drosophila*, la auto-renovación de las células germinales y la formación de neuronas y células gliales dependen de la adecuada expresión de dos miembros AGO: PIWI y AGO1 (Cox *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2001). En *C. elegans*, se observaron anomalías en el mantenimiento de CM debido a la pérdida de función de varias proteínas AGO que resultó en arresto del ciclo celular de células germinales (Cox *et al.*, 1998).

El aparente papel de las proteínas AGO en la autorenovación de CM parece ser ubicuo en plantas, donde los tejidos y órganos se generan a partir de la actividad de células pluripotentes no diferenciadas de los meristemos apicales. En *Arabidopsis* el mantenimiento de un conjunto de células indiferenciadas en el MAB en los estadios tardíos de la embriogénesis es controlado por dos miembros de la familia AGO, AGO1 y ZWILLE (ZLL) (Bohmert *et al.*, 1998; Moussian *et al.*, 1998; Lynn *et al.*, 1999). Embriones maduros zll tienen meristemos apicales desorganizados/interrumpidos en los que las CM se diferencian y no generan nuevos órganos durante el desarrollo postembrionario (Moussian *et al.*, 1998). La observación de que la expresión del gen STM, también implicado en el mantenimiento del polo apical (Long *et al.* 1996), se reducía en plantas zll también sugiere que ZLL puede definir la información posicional dentro del ápice del brote (Moussian *et al.*, 1998). En el pino de Brasil (*Araucaria angustifolia*), *AaAGO* se induce durante el desarrollo zigótico temprano y maduración, el inicio del crecimiento de las plántulas y en megagametofitos maduras. Esto parece indicar que está implicado en la regulación de la formación del MA durante el desarrollo zigótico temprano y el inicio del crecimiento de las plántulas y que las proteínas AGO pueden desempeñar un papel durante el desarrollo de las semillas en gimnospermas (Schlögl, dos Santos, Vieira, *et al.*, 2012). *AaAGO* también cambia su expresión durante la progresión de la ES en pino brasileño (Schlögl, dos Santos, do Nascimento Vieira, *et al.*, 2012). Cabe mencionar que el gen PgAGO de *P. glauca* es necesario para el correcto desarrollo de los embriones somáticos, específicamente en la diferenciación del MA, con una localización del transcrito asociada a los meristemos apical y radicular en las fases tempranas de desarrollo del embrión (Tahir *et al.*, 2006). Es posible que alguno de los AGOs aislados en castaño, pueda tener una función similar durante la embriogénesis y el desarrollo, dado que fueron aislados a partir de embriones somáticos en desarrollo y por lo tanto se están expresando durante la embriogénesis.

Por otra parte, los mutantes *ago1* de *Arabidopsis* son deficientes en su capacidad de formar RAs, indicando una implicación de AGO1 en dicho proceso. Este defecto en la formación de RAs se correlaciona con una alteración de la homeostasis de auxina e hipersensibilidad a la luz y con la acumulación de ARNm de ARF17 en el hipocótilo de los mutantes *ago*, lo cual indica que AGO1 regula los genes implicados en la interacción entre auxina y luz durante el desarrollo de RAs (Sorin *et al.*, 2005). En *E. globulus*, se mostró que el tratamiento con luz roja de las plantas madre aumentaba la capacidad de enraizamiento de los brotes *in vitro* e inducía la expresión de AGO1 en los dos primeros días tras inducción del enraizamiento (Ruedel *et al.*, 2015). Esta inducción puede estar relacionada con la desregulación del represor ARF17 y la inducción de genes GH3. El análisis de expresión de AGO1 durante la inducción de RAs en castaño, podría indicarnos si participa en este proceso.

Sería interesante analizar la expresión de los genes *CsAGO1*, *CsAGO4* y *CsAGO5* en tejidos vegetativos y reproductivos de castaño, así como en la ES y en otros procesos de regeneración, para asociar su posible función de forma más concreta a procesos morfogénéticos, así como estudios de regulación postranscripcional.







5. Gen CPE (*crown preferentially expressed*)

5.1 Introducción

5.1.1 Proteínas ricas en glicina (GRPs)

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) pertenecen a una gran familia que se caracteriza por la presencia de altas proporciones de residuos de glicina, hasta el 60-70% del total de aminoácidos, con una disposición en repeticiones (Gly)_n-X variables. Aunque los primeros genes que codificaban GRPs se aislaron en plantas, se han encontrado miembros de esta familia en una amplia variedad de organismos, desde cianobacterias a animales (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

Basándose en la variabilidad de las repeticiones de glicina y en la presencia de otros dominios conservados en algunas GRPs, esta familia se dividió en cinco clases distintas en plantas (Fusaro *et al.*, 2001; Bocca *et al.*, 2005; Mangeon *et al.*, 2010). La clase I de GRPs tiene una región de alto contenido en glicina con repeticiones (GGX)_n. La Clase II de GRPs presenta una zona rica en cisteína en el extremo C-terminal. La clase III de GRPs contiene un menor contenido en glicina comparado con las otras clases y dentro de esta clase existe un subgrupo que contiene un motivo característico oleosina. La clase IV de GRPs o GRPs de unión a ARN, además del dominio Glycine-rich (GR) presenta un motivo de reconocimiento de ARN (RRM) o un dominio “cold-shock” (CSD) y algunos miembros también contienen dedos de zinc CCHC en su estructura. Dependiendo de la diversidad de la disposición de los dominios, la clase IV de proteínas GRPs se subdivide en IVa (contienen un motivo RRM además del dominio GR), IVb (contienen un motivo RRM y un dedo de zinc CCHC), IVc (contienen un dominio CSD y dos o más dedos de zinc) y IVd (contienen dos RRM). La clase V de GRPs se distingue de la clase I o III en la presencia de patrones mezclados de repeticiones de glicina (Figura 19). Las proteínas GRPs pueden contener un péptido señal que las dirige a compartimentos subcelulares específicos y podría indicar el transporte a través de membranas (Mangeon *et al.*, 2010).

Los genes *GRPs* presentan patrones de expresión específicos de tejido, regulados por el desarrollo y/o diferentes factores bióticos y abióticos como estrés hídrico, daño, infección, shock por frío, ácido abscísico y ácido salicílico (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Se han encontrado proteínas GRPs en varias especies vegetales y se han identificado más de 150 genes *GRP* en análisis del transcriptoma o del genoma completo en caña de azúcar, eucalipto, *Arabidopsis* y arroz (Fusaro *et al.*, 2001; Bocca *et al.*, 2005).

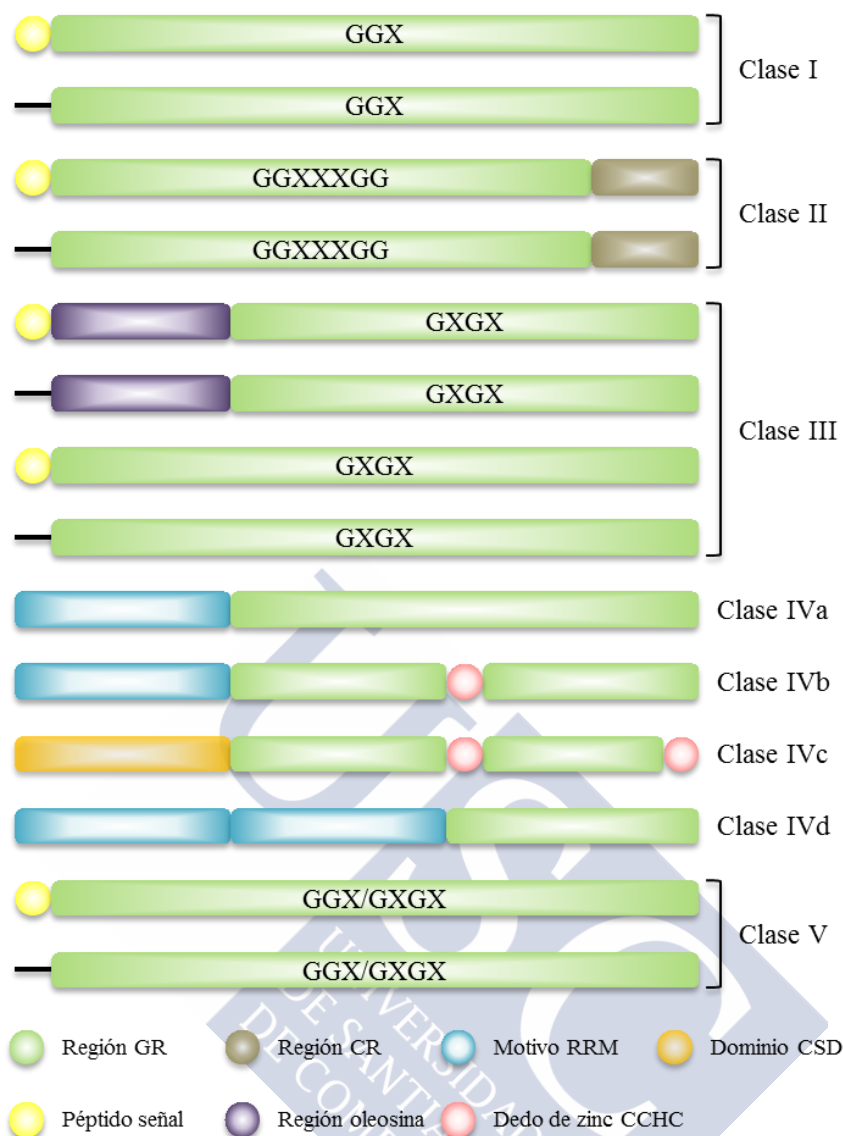


Figura 19.- Representación esquemática de la clasificación de las proteínas ricas en glicina (GRPs) en plantas. Se indican: el péptido señal, la región rica en cisteína (CR), la región oleosina, el motivo de reconocimiento de ARN (RRM), la región rica en glicina (GR), el dedo de zinc CCHC y el dominio “cold-shock” (CSD). Las distintas repeticiones GR se indican encima de cada dominio GR donde G representa glicina y X cualquier aminoácido.

La variabilidad de la estructura de las proteínas GRPs junto con los diversos patrones de expresión y de regulación y las diferentes localizaciones subcelulares indican que estas proteínas tienen funciones muy distintas y participan en varios procesos biológicos independientes en plantas (Bocca *et al.*, 2005). Se ha demostrado que las proteínas GRPs desempeñan una función estructural en la pared celular, están implicadas en defensa y en varias respuestas incluyendo estrés osmótico y estrés por frío no limitado solo a la presencia del dominio CSD celular (Park *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2013; Giarola *et al.*, 2016). También se ha demostrado que las GRPs están involucradas en distintos procesos de desarrollo como la elongación celular, el control del tiempo de floración y el desarrollo, o la regulación del desarrollo de los cloroplastos (Fusaro *et al.*, 2007; Streitner *et al.*,

2008; Mangeon *et al.*, 2009, 2016; Jiang *et al.*, 2014). Además estas proteínas también están implicadas en la fertilidad, en la hidratación y competencia del polen debido a su dominio oleosina, en la transducción de señales actuando como ligando extracelular de las proteínas quinasa, en el empalme del ARN y en regulación del procesamiento pri-miARN (Braun *et al.*, 1997; Mayfield y Preuss, 2000; Park *et al.*, 2001; Schöning *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012; Köster *et al.*, 2014).

5.1.2 QrCPE (*Q. robur* crown preferentially expressed)

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se aisló la secuencia completa de un ADNc de 584 pb que se denominó *QrCPE* (*Q. robur* crown preferentially expressed) y que codifica una GRP de 79 aminoácidos con un peso molecular de 8,4 kDa y un pI de 6.13 (Gil *et al.*, 2003). *QrCPE* contiene una región hidrofóbica con las características de un péptido señal (PS) de pared celular y la proteína madura contiene un dominio rico en residuos de glicina e histidina y dos sitios de fosforilación. El número de acceso del GenBank de *QrCPE* es AJ271778 para el ADNc y CAB72442 para la proteína. En brotes de roble cultivados *in vitro*, los niveles de expresión de *QrCPE* fueron mayores en los establecidos a partir de ramas de la copa (C) (capacidad morfogenética y tasa de enraizamiento muy bajas) que en los brotes con características juveniles, establecidos a partir de renuevos basales (RB) del mismo árbol adulto. En material de campo, la expresión del gen disminuyó progresivamente durante la maduración de la planta, lo que sugiere que las condiciones de *in vitro* cambian la expresión del gen dependiendo del estado ontogenético del material (Gil *et al.*, 2003).

El ortólogo de *QrCPE* en castaño (*CsCPE*) fue aislado a partir de embriones somáticos de castaño. Se identificó la secuencia completa de ADNc de 582pb, que codifica una proteína de 81 aminoácidos con alta homología con *QrCPE*. En general, las características biológicas y a nivel de secuencia de la proteína *CsCPE* son muy similares a las de la proteína *QrCPE* (Vielba *et al.*, 2008). La abundante expresión de *QrCPE* en embriones zigóticos y somáticos de roble (Gil *et al.*, 2003) apuntaban a un posible papel del gen en el desarrollo embrionario

En este trabajo hemos aislado la ORF del gen *CPE* en 52 especies de diferentes familias, con objeto de estudiar el grado de conservación de este gen en especies filogenéticamente distantes. También hemos usado el sistema de ES de *Q. robur*, *C. sativa* y *Q. suber* para investigar la implicación del gen en la iniciación y el desarrollo de embriones somáticos. Además, se analizó la expresión del gen en embriones zigóticos de castaño y en material post-embrionario de roble y alcornoque.

5.2 Resultados

5.2.1 Identificación y análisis de las diferentes secuencias CPE

Para poder aislar y estudiar el grado de conservación de *CPE* en especies filogenéticamente distantes se diseñaron los cebadores Fw: 5'-AAGGAAAATGGCTTACTCAAAGAC-3' y Rv: 5'-AGACCGACCAAAATTAGATTAATCC-3' a partir de la secuencia de roble. Mediante PCR, usando como molde ADNc obtenido por retrotranscripción del ARN extraído de hojas/acículas/yemas/frondes/embriones de las especies de estudio, se aisló un fragmento de aproximadamente 260 pb en cada una de las 52 especies de diferentes familias, herbáceas y leñosas, incluyendo angiospermas (monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas y helechos (Tabla 1 material y métodos). Una vez secuenciadas, se comprobó mediante BLASTN y BLASTX que las secuencias de ADNc obtenidas presentaban una elevada homología con la parte codificante de la secuencia de *QrCPE* de roble (97%) por lo que denominamos a estos genes según la especie de la que fueron aislados seguido de *CPE* (Tabla 1).

La secuencia de nucleótidos consenso de *CPE* y su secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la Figura 20. La ORF, desde el codón de iniciación (ATG) hasta el codón de terminación (TAG), codifica una proteína pequeña de aproximadamente 80 aminoácidos cada una con masa molecular de 8,77 KDa y un pI teórico de 6,19. Esta proteína es rica en residuos de glicina e histidina (13,6% y 16% respectivamente). La vida media estimada de la proteína, es de entre 10 y 30 h dependiendo de los tejidos y organismos. El índice de inestabilidad es de 12,54, lo que clasifica la proteína como estable. El índice alifático es de 72,22 y el valor GRAVY (Grand average of hydropathicity) es de -0,686. La proteína CPE presenta un dominio conservado GRP que la convierte en miembro de la familia de proteínas Glycine-rich (GRPs) y contiene un PS hidrofóbico N-terminal de 26 aminoácidos. La proteína putativa madura (excluyendo el PS) tiene un peso molecular de 6,03 kDa, un pI teórico de 6,2 y un porcentaje de glicina e histidina de 18,2% y 23,6% respectivamente.

```

aggaaaaatggcttactcaaagacttttccttcttcttgggtcttgtctttgctgtggttctt
M A Y S K T F L L L C L V F A V V L
ctcgtctcctccgaggtctcagctcgtgagctagctcaggagactgtgcaaactgacgca
L V S S E V S A R E L A Q E T V Q T D A
gtgaatgaggacaagcatggatcaccatggacacgatcacaggcacggacacggccat
V N E D K H G H H H G H D H R H G H G H
ggccatggacacccatggcaaaccaggtcatggtgctgctggagagaaacttgaagagacc
G H G H H G K P G H G A A G E K L E E T
gacccaaaattagattaatcc
D Q N

```

Figura 20.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc consenso de CPE. Se colorean en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG), los cebadores usados para la obtención de la secuencia mediante PCR se indican con flechas y los usados en los análisis de qPCR están subrayados. La secuencia del péptido señal N-terminal está coloreada en azul.

El análisis de las secuencias obtenidas mediante la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2015) confirmó la presencia de un dominio GRP conservado en todas las proteínas deducidas, lo que las convierte en miembros de la familia de proteínas ricas en glicina (GRP).

	N	H	C										
	Péptido señal			Proteína madura									
QrCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	G--HGHHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	79			
QsCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	G--HGHHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	77			
QruCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
CsCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
Cs12CPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PO11CPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
JrCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AgCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
BpCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
HhCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
IaCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PcCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
BoCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
BsCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AtCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
CfCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
SnCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AdCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AuCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
RpCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
Cs1CPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
RpsCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PpoCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
GbCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
OeCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
FeCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
MgCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
SvCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
TcCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
EgCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AaCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
JcCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PmCPEi	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PrCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PpCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PnCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PsCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
ZmCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AnCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PoCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AcvCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
FxaCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
MdCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
EjCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PavCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
AhCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
StCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
NtCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
FcCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
MaCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
VvCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
PaCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
HgCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
SpCPE	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	74			
		N-mir.	CK2				Región rica en histidina						
Consenso	MAYSKTFLLL	GLVFAVLLV	SSEVSARELA	QETVQTDVAVN	EDKHGHHHGH	DHRHGHGHGH	GHHGKPGHGA	AGEKLEETDQ	N	81			
			PKC										

Figura 21.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de los diferentes ADNc (CPE) aislados en este estudio con las proteínas QrCPE (número de acceso AJ271778) y CsCPE, realizado con el programa Clustal X 2.1. Los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias aparecen subrayados en negro y los que son similares en gris. Sobre las secuencias se localiza el péptido señal con las regiones N, H y C, el sitio de escisión, la proteína madura, la región rica en histidina, el sitio de N-miristoilación (N-mir) y los dos sitios de fosforilación, para la proteína quinasa C (PKC) y para la caseína quinasa II (CK2).

En el extremo N-terminal de todas las secuencias aisladas en este trabajo se localizó un PS hidrofóbico de secuencia MAYSKTFLLLGLVFAVLLVSSEVSA entre los aminoácidos 1-26

con un sitio de escisión predicho entre los aminoácidos Ala-26 y Arg-27, lo que les confiere características de proteínas secretadas (Petersen *et al.*, 2011). La región N de este PS se localiza en la posición 1-6, la región H en la posición 7-18, la región C en la posición 19-26 y la región 27-81 es un dominio no citoplasmático (Figura 21) (Käll *et al.*, 2004). Los resultados de predicción de localización subcelular la clasifican como una proteína extracelular con una probabilidad del 99% (Briesemeister *et al.*, 2010a, 2010b; Chang *et al.*, 2013) o de pared celular (Chou, 2005; Shen y Chou, 2006; Chou y Shen, 2007, 2008, 2010), lo que indica que posiblemente la proteína CPE esté dirigida a la pared celular. La búsqueda de motivos característicos en la base de datos PROSITE (Sigrist *et al.*, 2002, 2012; de Castro *et al.*, 2006) reveló que las proteínas CPE contienen también una región rica en histidina en la posición 44-68; un sitio de N-miristoilación en la posición 11-16 y dos sitios de fosforilación, uno para la proteína quinasa C (PKC) en la posición 25-27 y otro para la caseína quinasa II (CK2), que indican una posible regulación por quinasas (Figura 21).

Como se puede apreciar en la Figura 21, todas las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los genes *CPE* aislados en este trabajo están sumamente conservadas en todas las especies ya que las diferencias se limitan a cambios de uno o dos aminoácidos, o a la presencia de una o dos deleciones en las secuencias de *Q. robur* y *Q. suber* respectivamente.

5.2.2 Análisis filogenético de CPE

Para el análisis de homología hemos usado la secuencia consenso de nucleótidos y de aminoácidos predicha de las secuencias de este estudio, dado que están muy conservadas en todas las especies. La comparación de la secuencias con las de las bases de datos fue llevada a cabo mediante BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La mayor homología entre la proteína CPE deducida con el resto de proteínas se ubica a nivel de péptido señal (PS), por lo que también analizamos este fragmento para encontrar similitudes con otros péptidos similares de otras proteínas.

Tabla 13.- Secuencias nucleotídicas homólogas a la secuencia de *CPE* obtenidas mediante BLASTN de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se muestra el e-valor que indica la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar, el porcentaje de identidad y el número de acceso para todas las secuencias.

Descripción	E-valor	Identidad (%)	Nº de acceso
<i>Q. robur</i> mRNA for phase-change related protein	4,00e-116	97%	AJ271778
<i>Q. robur</i> (clone MVAX3) mRNA fragment	5,00e-46	95%	L41866
<i>Ricinus communis</i> Glycine-rich protein DC7.1 precursor, putative, mRNA	2,00e-24	91%	XM_002528972

El análisis de la secuencia de nucleótidos mediante BLASTN indicó que *CPE* tenía un 97% de homología con la secuencia *QrCPE* de roble y un 95% de similitud con una secuencia de 126 pb que corresponde a un ARNm de *Q. robur* (clon MVAX3) aislado por “differential display” durante la identificación de marcadores moleculares de cambio de fase en roble (L41866.1). Además, la secuencia de nucleótidos de *CPE* también presentó un 91% de identidad con un putativo precursor de *DC7.1* de *R. communis* (XM 002528972) (Tabla 13). La homología que presentan estas secuencias de nucleótidos se puede observar en la Figura 22.



Figura 22.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas homólogas a la secuencia de *CPE*, obtenidas mediante BLASTN de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), realizado con el programa Clustal X 2.1. Los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias aparecen enmarcados en negro. Los números de acceso de las secuencias usadas en el alineamiento se encuentran en la Tabla 13.

El análisis de homología de la proteína de *CPE* deducida mediante BLASTP reveló una cierta identidad de secuencia con dos proteínas GRP codificadas por dos ADNc aislados de suspensiones celulares de *D. carota* durante la inducción de ES: DC7.1 (47%, P37704.1) y DC9.1 (59%, P37703.1). La similitud entre estas proteínas y *CPE* se observa sobre todo en la secuencia señal N-terminal donde guardan una identidad de un 68% con DC7.1 y 64% con el de

DC9.1. CPE también presentó homología con precursores de la proteína DC7.1 de *R. communis* (86%, XP_002529019.1) y de *Vitis* (70%, XP_010644510.1). A nivel de PS, CPE mostró un 88% de identidad de secuencia con el de DC7.1 de *R. communis*, 84% con el de DC7.1 de *V. vinifera* y 78% con el PS de la proteína GRP DC9.1 de *R. communis* (XP_002531213.1) (Tabla 14).

Tabla 14.- Secuencias aminoacídicas homólogas a la secuencia codificada por CPE obtenidas mediante BLASTP de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se muestra el e-valor que indica la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar, el porcentaje de identidad y el número de acceso para todas las secuencias.

Descripción	E-valor	Identidad (%)	Nº de acceso
phase-change related protein [<i>Q. robur</i>]	1,00e-43	96%	CAB72442.1
Glycine-rich protein DC7.1 precursor, putative [<i>R. communis</i>]	2,00e-09	86%	XP_002529019
phase change-related protein [<i>V. cinerea</i> var. helleri x <i>V. riparia</i>]	3,00e-09	74%	ADD51188.1
putative glycine-rich protein [<i>P. dulcis</i>]	0.013	71%	ABR13286.1
PREDICTED: glycine-rich protein DC7.1 isoform X2 [<i>V. vinifera</i>]	3,00e-08	70%	XP_010644510
PREDICTED: cold and drought-regulated protein CORA-like [<i>Beta vulgaris</i> subsp. vulgaris]	6,00e-05	60%	XP_010683012
RecName: Full=Glycine-rich protein HC1 [<i>Oxybasis rubra</i>]	0.001	59%	P11898.1
RecName: Full=Glycine-rich protein DC9.1 [<i>D. carota</i>]	0.001	59%	P37703.1
Glycine rich protein [<i>C. sativus</i>]	0.002	59%	CEG62450.1
actinorizal nodulin AgNOD-GHRP [<i>A. glutinosa</i>]	6,00e-08	58%	AAD00171.1
PREDICTED: cold and drought-regulated protein CORA-like [<i>M. domestica</i>]	8,00e-07	57%	XP_008345028
dormancy-associated protein [<i>Pisum sativum</i>]	0.001	57%	AAB84194.1
tyrosine and lysine rich cell wall protein [<i>S. tuberosum</i>]	2,00e-04	56%	ADB93804.1
cell wall protein [<i>S. tuberosum</i>]	3,00e-04	56%	ABY21251.1
ag164 [<i>A. glutinosa</i>]	4,00e-06	55%	CAA69708.1
glycine-rich protein 1 [<i>B. hygrometrica</i>]	0.009	52%	ABV64742.1
GBR5 [<i>Panax ginseng</i>]	1,00e-05	50%	AAP55852.1

RecName: Full=Glycine-rich protein DC7.1; Flags: Precursor [<i>D. carota</i>]	6.4	47%	P37704.1
hypothetical protein JCGZ_00967 [<i>J. curcas</i>]	4.3	43%	KDP39210.1
putative glycine rich protein precursor [<i>P. sativum</i>]	1.2	39%	CAH40798.1

Como se muestra en la Tabla 14, la secuencia CPE presentó también elevada homología con proteínas ricas en glicina de varias especies como GRPs de *P. dulcis*, *P. sativum*, *Oxybasis rubra* o *Panax ginseng*, con valores de identidad que oscilan entre un 39 y un 71% a nivel de proteína completa, y entre un 64 y un 85% a nivel de PS. Entre las proteínas GRP con las que CPE muestra homología, cabe citar las proteínas GRP de pared de celular de *S. tuberosum* y *B. hygrometrica*, con las que guarda similitudes de entre 52% y el 56%, así como proteínas de otras familias como PsDRM2 de *P. sativum*, y con varias proteínas CORA-like como la de *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* y *M. domestica*.

Continuando con el análisis, la proteína CPE mostró una identidad de entre 55 y 58% con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos ADNc (*AgNt84* y *ag164*) aislados de nódulos de raíz de *A. glutinosa*, que codifican proteínas ricas en glicina e histidina. En este caso a nivel de PS se alcanzaron porcentajes de homología superiores al 80%. Cabe mencionar también la homología del 74% que la secuencia CPE presenta con una proteína PCr (Phase change-related) de *Vitis*, alcanzando un 85% a nivel del PS. Con relación a otras secuencias asociadas a respuestas bióticas, también se encontró una elevada identidad de secuencia con el péptido antimicrobiano shep-GRP de *Capsella bursa-pastoris* (73%) así como con la proteína rica en glicina de *C. sativus* con un nivel de homología del 62% a nivel de PS. Entre las secuencias proteicas con las que CPE también mostró homología se incluyen JCGZ de *J. curcas* con una 69% de identidad a nivel de PS y otras glicoproteínas ricas en histidina de esta especie, con una homología de en torno al 50%. Analizando solamente el PS N-terminal de la proteína CPE, se encontró también un 63% de similitud de secuencia con CYC02_CATRO de *Catharanthus roseus* (Tabla 14). La homología que presenta la secuencia de aminoácidos de CPE con otras proteínas se puede observar en la Figura 23.

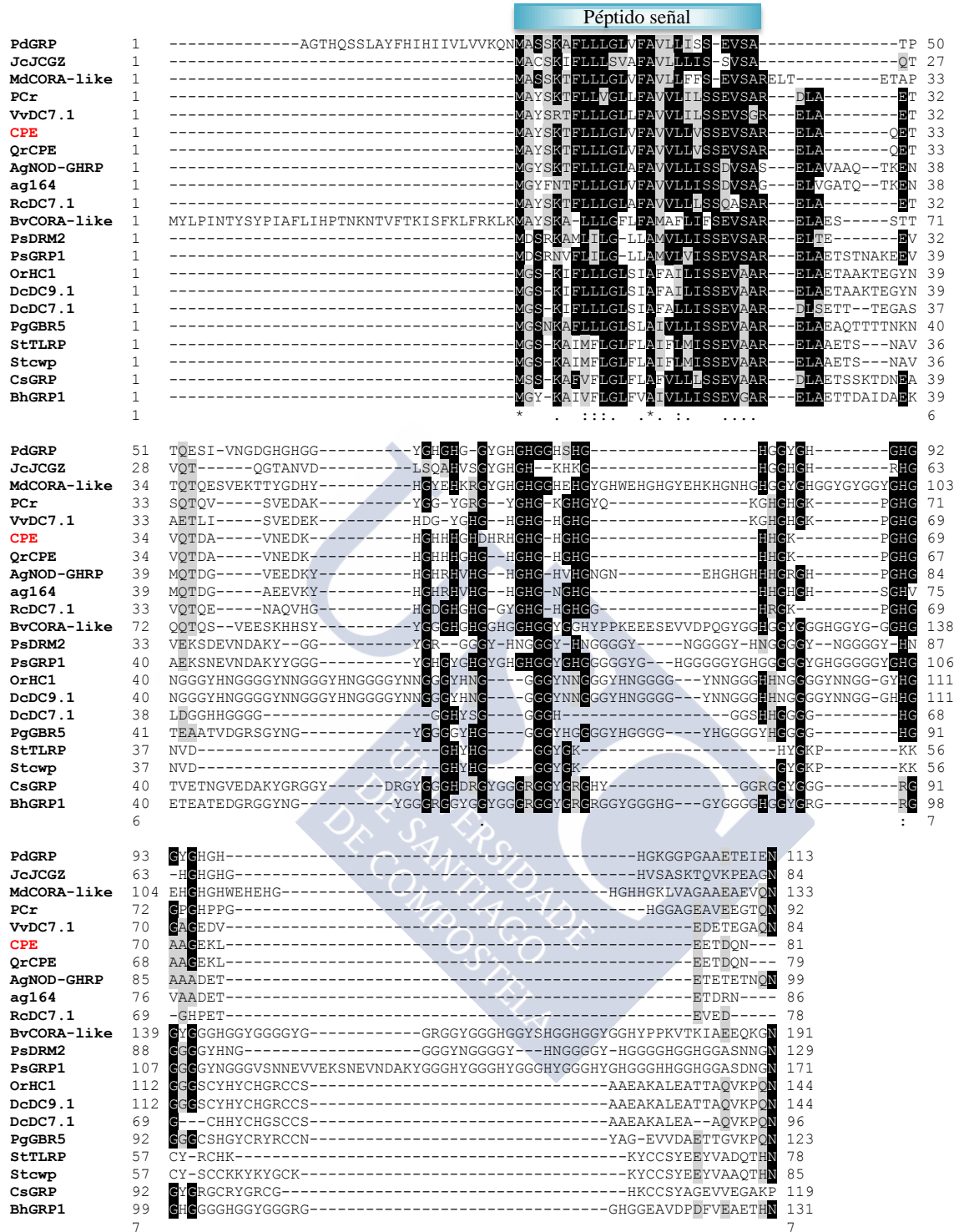


Figura 23.- Alineamiento realizado con el programa Clustal X 2.1 de las secuencias aminoacídicas homólogas a la secuencia codificada por CPE obtenidas mediante BLASTP de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias aparecen enmarcados en negro y los que son similares en gris. Nótese el alto grado de similitud entre ellas a nivel del péptido señal. Los números de acceso de las especies utilizadas en el alineamiento se encuentran en la Tabla 14.

Para estudiar la relación filogenética de CPE con otras proteínas GRP y poder determinar la clase a la cual pertenece, se construyó un árbol filogenético usando el programa MEGA7

(Kumar *et al.*, 2016) con el algoritmo Neighbor joining incluyendo proteínas GRP previamente clasificadas (Figura 24). Se usaron las proteínas AtGRP5 (Clase I), AtGRP9 (Clase I), AtGRP17 (Clase III), AtGR-RBP2 (Clase IVa), AtGR-RBP4 (Clase IVa), AtGR-RBP8 (Clase IVa), AtGR-RBP7 (Clase IVa), AtRZ1a (Clase IVb), AtCSP1 (Clase IVc), y AtCSP2 (Clase IVc) de *A. thaliana* (Mangeon *et al.*, 2010), la proteína CpGRP1 (Clase II) de *Craterostigma plantagineum* (Giarola *et al.*, 2016), BhGRP1 (Clase V) de *B. hygrometrica* (Wang *et al.*, 2009) y la proteína LsGRP1 (Clase II) de *Lilium* “Stargazer” (Lin y Chen, 2014). Como se puede observar en la Figura 24, el análisis mostró que la proteína CPE se agrupa con BhGRP1 que pertenece a la clase V.

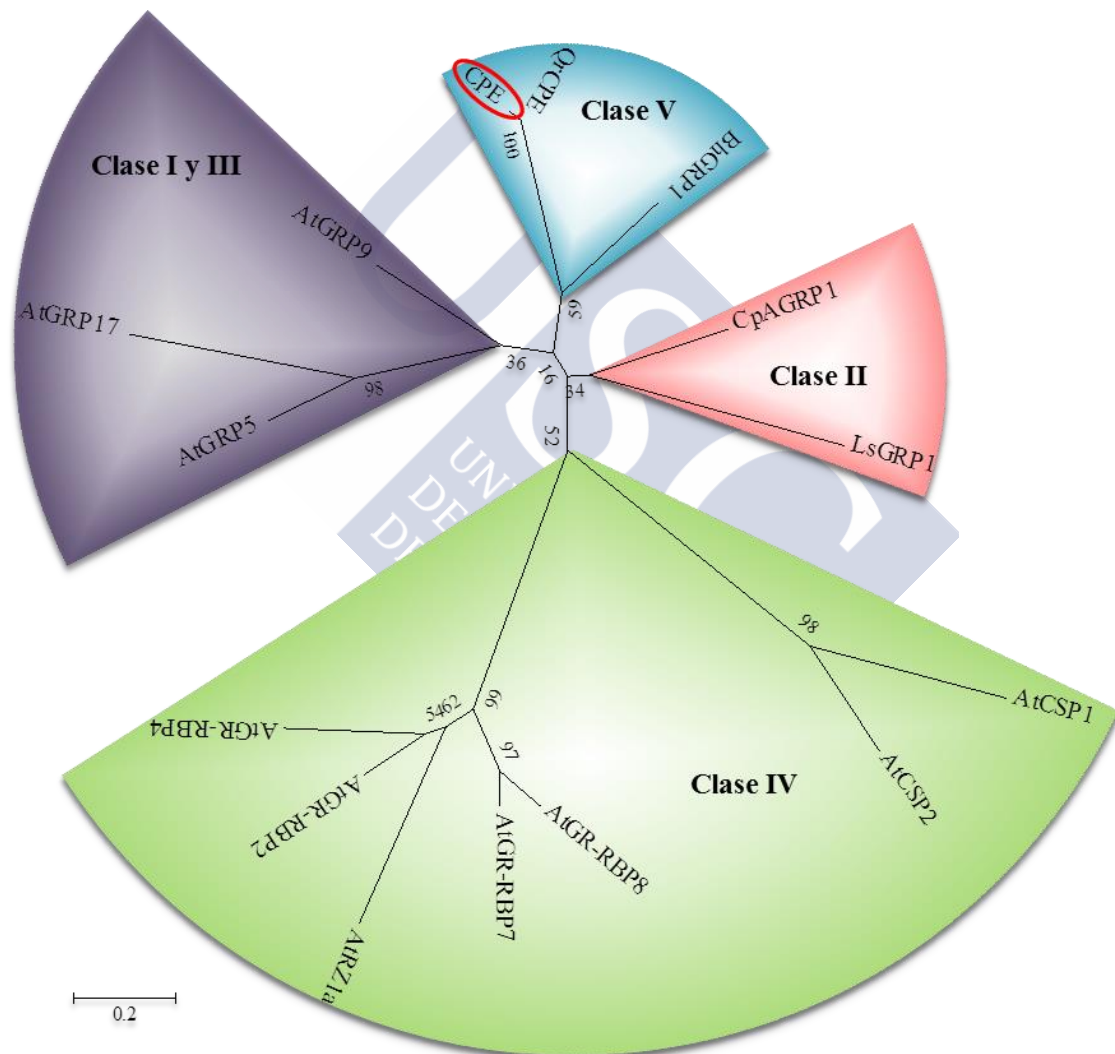


Figura 24.- Relaciones evolutivas de CPE con proteínas GRP de otras especies. El árbol filogenético se obtuvo a partir de un alineamiento realizado con CLUSTALW usando una matriz Gonnet. La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de las ramas = 6.15624800. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agrupan juntos (1000 replicados) se muestran en la base de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron inferidas usando el método de sustitución de Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965) y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis implicó 15 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían huecos se eliminaron. Hubo un total de 38 posiciones en el conjunto

de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Números de acceso de secuencias usadas para el análisis: AtGRP5 (At3g20470), AtGRP9 (At2g05440), AtGRP17 (At5g07530), AtGR-RBP2 (At4g13850), AtGR-RBP4 (At3g23830), AtGR-RBP8 (At4g39260), AtGR-RBP7 (At2g21660), AtRZ1a (At3g26420), AtCSP1 (At4g36020), AtCSP2 (At4g38680), CpGRP1 (ALQ43973.1), BhGRP1 (ABV64742.1), LsGRP1 (AAL61539.1) y QrCPE (AJ271778).

5.2.3 Análisis de la expresión del gen CPE durante la embriogénesis

Para determinar la posible implicación del gen *CPE* en la embriogénesis de Fagáceas hemos procedido al análisis de expresión durante el desarrollo de embriones zigóticos y somáticos de castaño, durante la inducción y desarrollo de embriones somáticos de roble, así como en embriones somáticos de *Q. suber*, mantenidos en proliferación mediante embriogénesis secundaria.

5.2.3.1 Expresión del gen CPE durante la EZ de castaño

La EZ es un proceso complejo influenciado por un gran número de factores genéticos y ambientales, por ello la caracterización de genes que participan en dicho proceso de desarrollo nos permitirá conocer los mecanismos moleculares implicados en el mismo. Para el estudio del posible papel del gen *CsCPE* durante la EZ se ha procedido al análisis de su patrón de expresión durante el desarrollo de embriones zigóticos de castaño mediante hibridación *in situ*. Se han utilizado semillas inmaduras y maduras recogidas del mismo árbol a distintos tiempos durante su desarrollo, a partir de las que se aislaron óvulos con embriones en diferentes estadios.

En los embriones globulares se detectó una expresión de *CsCPE* generalizada con una mayor localización en el polo apical del embrión (Figura 25A). Este patrón se mantiene en embriones en estado corazón, donde se aprecia una señal más intensa en la protodermis del polo apical incluyendo la zona donde se están iniciando los cotiledones (Figura 25C). A medida que avanza el desarrollo del embrión, en estado torpedo, hay en general una señal más tenue en el cuerpo del embrión, con acumulación del transcrito en la protodermis y en los cotiledones (Figura 25E, F). En embriones en estado cotiledonar, el transcrito se localizó de manera muy definida en la protodermis, en las capas más externas del MA y la zona axilar de los cotiledones, en la zona distal del polo radicular y células precursoras del tejido fundamental (Figura 25H, I, J y K).

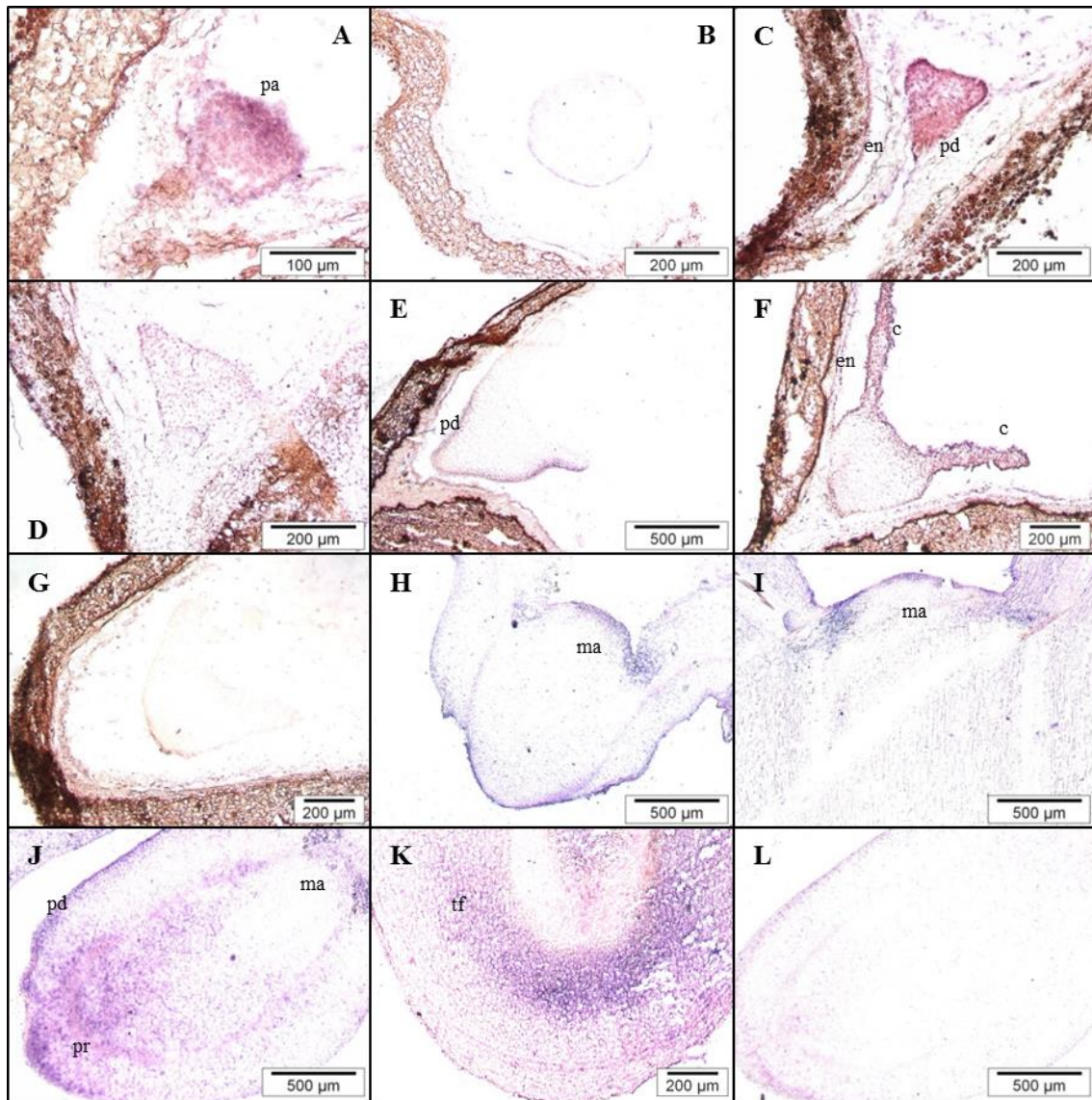


Figura 25.- Localización *in situ* del transcrito *CsCPE* en secciones longitudinales de embriones zigóticos de castaño en estadio globular (A y B), corazón (C y D), torpedo (E, F y G), cotiledonar (H e I) y eje embrionario (J, K y L), hibridados con la sonda específica *CsCPE* antisentido (A, C, E, F, H, I, J y K) y sentido (B, D, G y L). Nótese la ausencia de señal en los controles. c (cotiledón); en (endotelio); ma (meristemo apical); pa (polo apical); pr (polo radicular); pd (protodermis); tf (tejido fundamental).

5.2.3.2 Expresión de *CPE* durante la inducción de embriones somáticos.

El análisis de la expresión génica en el explanto original a partir del cual se inician los embriones somáticos es de gran interés a la hora de estudiar los eventos moleculares que controlan el inicio del proceso de ES, cuando tienen lugar la dediferenciación y reprogramación celular, que dará lugar a un nuevo patrón de desarrollo. Para averiguar si el gen *CPE* está implicado en esa etapa, se analizó el patrón de expresión celular del gen durante la inducción de embriones somáticos de roble a partir de brotes *in vitro* procedentes de arboles adultos (Toribio *et al.*, 2004; Valladares *et al.*, 2006). Para ello se utilizaron callos embriogénicos del genotipo Sainza, a partir de los que se desarrollaron embriones y estructuras

embriogénicas. Se observó una elevada señal de hibridación en los agregados celulares embriogénicos o masas proembriogénicas, con una mayor acumulación en la zona periférica de dichas masas, que está formada por células meristemáticas. Por el contrario no se detectó señal de hibridación en la zona interior del callo, la cual está formada por células parenquimáticas (Figura 26A y B). En embriones globulares y oblongos también se detectaron niveles altos de expresión, especialmente en la protodermis y capas celulares próximas a la protodermis (Figura 26D). En embriones torpedo y cotiledonar temprano, la expresión se detectó en estos tejidos y en el en el polo radicular (datos no mostrados). En embriones cotiledonares más avanzados, la abundancia del transcrito de *QrCPE* se localizó en las células distales del MR, incluyendo las células iniciales del tejido fundamental y de la columela así como en las células precursoras del córtex y columela (Figura 26E y F). Estos embriones también mostraron una señal bastante intensa en el MA del embrión y meristemos axilares de los cotiledones (Figura 26F).

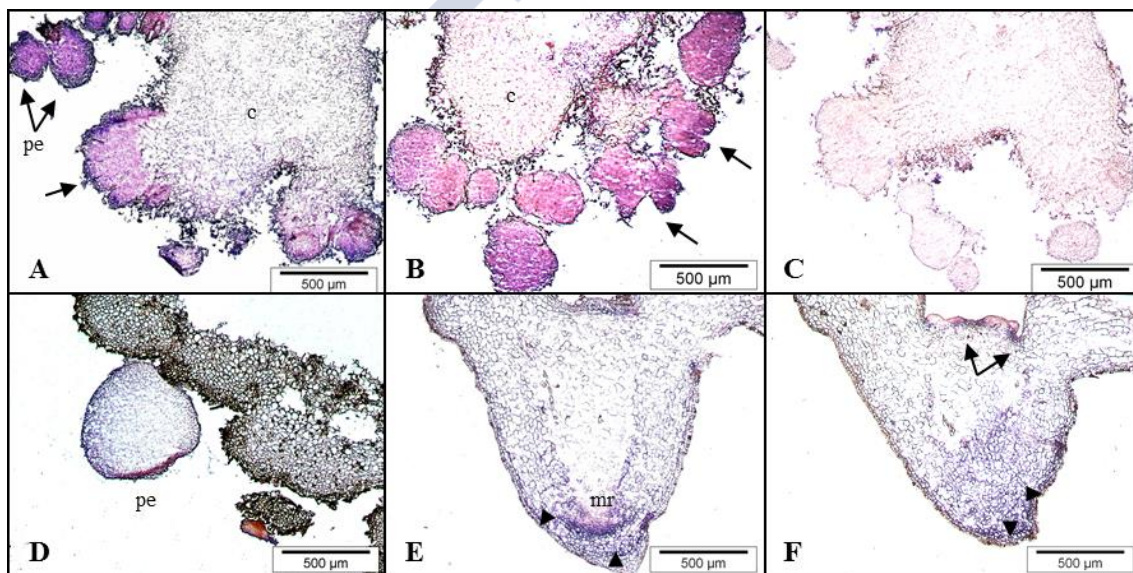


Figura 26.- Localización *in situ* del ARNm del gen *QrCPE* durante el proceso de inducción de embriones somáticos de roble a partir de ápices caulinares de la línea Sainza hibridados con la sonda específica antisentido (A, B, D, E y F) y sentido (C). En las imágenes A, B y C se muestran secciones de callo desarrollado en los explantos de hoja con agregados proembriogénicos (flechas) y proembriones emergiendo de las capas periféricas del callo, nótese la ausencia de señal en la sección control (C). Se muestran también secciones de un embrión oblongo unido al callo (D) y de secciones seriadas de un embrión cotiledonar (E y F) donde las flechas indican la expresión en las células precursoras de la columela y en el MA y zona axilar de los cotiledones. c (callo); mr (meristemo radicular); pe (proembrión).

5.2.3.3 Expresión del gen *CPE* durante el desarrollo de embriones somáticos mediante embriogénesis secundaria

La ES tiene lugar a través de una serie de estadios de desarrollo asociados con cambios morfológicos y bioquímicos influenciados por la actividad genómica. Aunque los embriones somáticos se parecen tanto morfológica como fisiológicamente a los zigóticos, se originan por vías diferentes (von Arnold *et al.*, 2002). El aislamiento de los embriones somáticos en distintos

estados de desarrollo, aprovechando la asincronía de los cultivos embriogénicos mantenidos por embriogénesis secundaria, nos permite estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de los mismos. Para ello hemos evaluado la expresión del gen mediante qPCR e hibridación *in situ* en embriones en diferentes estados de desarrollo.

5.2.3.3.1 Análisis de la expresión del gen CPE en embriones somáticos de castaño mediante qRT-PCR

Para determinar el posible papel del gen *CsCPE* durante el desarrollo de los embriones somáticos de castaño se usaron dos líneas embriogénicas establecidas a partir de embriones zigóticos de *C. sativa* (CI-3 y CI-9) y una línea embriogénica establecida a partir de embriones zigóticos de un híbrido *C. sativa x crenata* (HV-Z) con diferente capacidad de proliferación y mantenidas mediante embriogénesis secundaria (Vieitez, 1995; Corredoira y Vieitez, 2006). Se analizó la expresión relativa del gen mediante qPCR en embriones en estadios de desarrollo globular, torpedo y cotiledonar aislados a partir de los cultivos en proliferación.

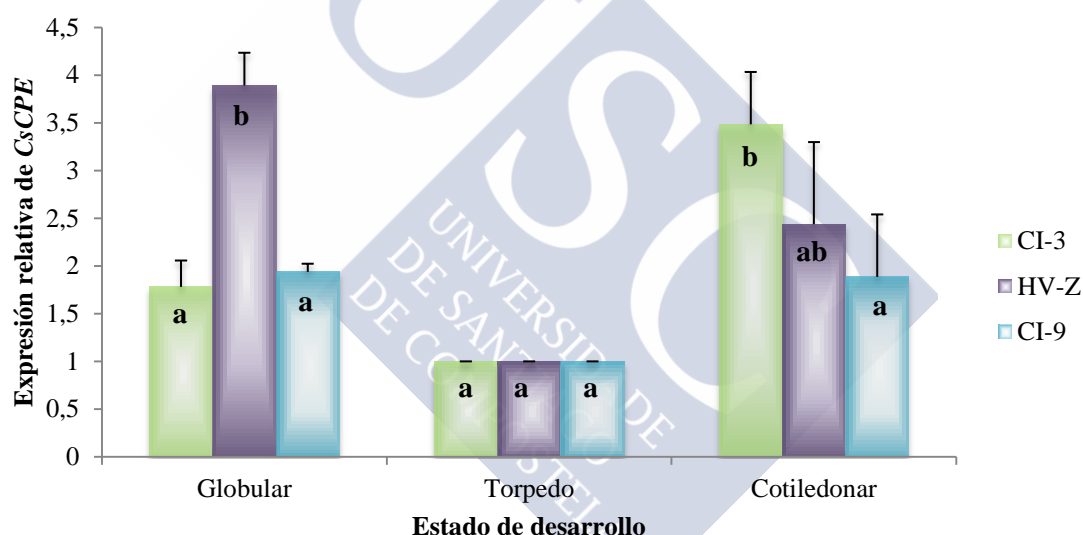


Figura 27.- Análisis mediante qPCR de la expresión del gen *CsCPE* en diferentes estadios del desarrollo de embriones somáticos de castaño de tres líneas embriogénicas (CI-3, HV-Z y CI-9). La expresión de los genes de referencia *Actina*, *Ubiquitina* y *Factor de elongación* se usó como control interno para normalizar los datos de expresión. Los resultados se expresan como valores relativos a la muestra con menor nivel de expresión (torpedo) y corresponden a la media de tres replicados biológicos \pm error estándar. Las barras indican el error estándar. Las diferentes letras representan diferencias significativas dentro de cada genotipo durante el desarrollo de los embriones ($P \leq 0,05$), de acuerdo con el test de Duncan.

Aunque existen diferencias en los niveles relativos del transcrito entre las distintas líneas, posiblemente debidos a diferencias genotípicas, en todas ellas los niveles más bajos se detectaron en los embriones torpedo, pero sin grandes variaciones durante la transición de globular a torpedo, con excepción de la línea HV-Z que experimentó un descenso significativo en los niveles de expresión. Salvo en los embriones cotiledonares de la línea CI3, que mostraron

niveles significativamente mayores que los embriones globulares y torpedo, en general los niveles de expresión no mostraron grandes diferencias durante la transición de torpedo a cotiledonar (Figura 27).

5.2.3.3.2 Análisis de la expresión de CPE durante el desarrollo de embriones somáticos secundarios mediante hibridación *in situ*

Para determinar si las diferencias observadas a nivel de expresión pueden estar asociadas a células o tejidos específicos, se analizó el patrón de expresión espacial del gen mediante hibridación *in situ* en los embriones somáticos en diferentes estados de histodiferenciación (globular, torpedo y cotiledonar) aislados a partir de cultivos en proliferación mantenidos mediante embriogénesis secundaria. El estudio se llevó a cabo en embriones en la línea CI-3 de castaño, dos líneas embriogénicas de roble (Sainza y B17) y una línea embriogénica de alcornoque (Qs3).

5.2.3.3.2.1 Castaño

En castaño, también se analizó la expresión en callo embriogénico durante el proceso de proliferación de embriones mediante embriogénesis secundaria a partir del que se forman los embriones. Se observó una elevada expresión en las estructuras pre-globulares que surgen del callo embriogénico en proliferación (Figura 28, flechas), mientras que apenas se detectó señal en las células parenquimáticas del mismo.

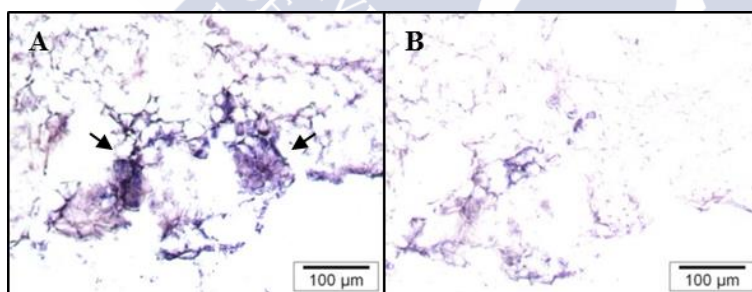


Figura 28.- Localización *in situ* del transcrito *CsCPE* en secciones de un callo embriogénico durante la proliferación mediante embriogénesis secundaria, hibridadas con la sonda específica antisentido (A) y sentido (B). Las flechas en A indican las estructuras preglobulares que surgen del callo (flechas). Nótese la ausencia de señal en la sección control.

A medida que avanza el desarrollo embriogénico se observó una expresión uniforme del gen *CsCPE* en todas las células de los embriones globulares con una acumulación preferencial del transcrito en la protodermis donde hay una elevada tasa de división celular (Figura 29 A, B y C) observándose este mismo patrón en los embriones oblongos (Figura 29 E). Esta expresión en la protodermis se mantiene en las siguientes etapas de desarrollo en las que también se detectó señal en la capa cortical externa y en el polo radicular (Figura 29 F-I). En embriones en estadio cotiledonar el transcrito se localizó en la protodermis, en la zona de elongación de los cotiledones, el polo radicular, así como también en las capas externas del MA y zona axilar de

los cotiledones (Figura 29 G y H). En el polo radicular de los embriones cotiledonares se observó una acumulación de la expresión en las células precursoras del tejido fundamental y de la columela (Figura 29 I). En algunos embriones se generan estructuras embriogénicas por embriogénesis recurrente, generalmente en la protodermis de los embriones globulares y en el polo radicular de los embriones torpedos, donde también se detectó abundante expresión de *CsCPE* (Figura 29 C y F, flechas).

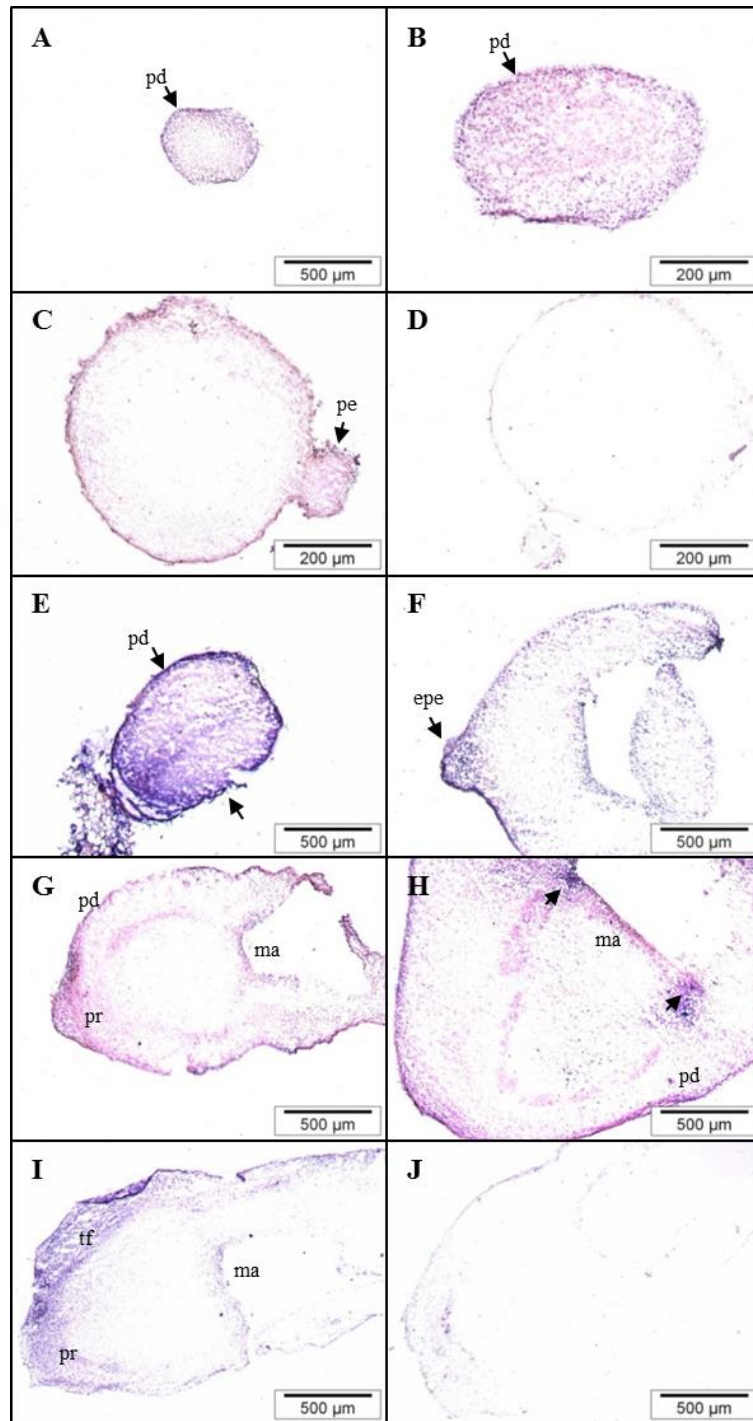


Figura 29.- Localización *in situ* del ARNm del gen *CsCPE* en secciones longitudinales de embriones somáticos de castaño (línea CI-3) en estadio globular (A, B, C y D), oblongo (E), torpedo (F) y cotiledonar (G, H, I y J), hibridados

con la sonda específica para *CsCPE* antisentido (A, B, C, E, F, G, H e I) y sentido o control (D y J). Se puede apreciar la ausencia de señal en los controles. En la sección C se muestra un proembrión surgiendo del embrión globular y en F una estructura proembriogénica que se origina en el polo radicular del embrión torpedo. Las flechas de la sección H indican la expresión en la zona axilar de los cotiledonares. epe (estructura proembriogénica); ma (meristemo apical); pr (polo radicular); pe (proembrión); pd (protodermis); tf (tejido fundamental).

5.2.3.3.2.2 Roble

En este estudio, la expresión del gen *QrCPE* en la ES de roble se realizó en las dos líneas embriogénicas B17 y Sainza. En embriones preglobulares y globulares el gen *QrCPE* se expresó de manera uniforme en todas las células (Figura 30 A), aunque de manera más intensa en las células protodérmicas, con división celular activa (Figura 30 C). En los embriones en estado globular más avanzado la señal de hibridación aparece más localizada en la protodermis y en las dos o tres capas celulares de la zona subprotodérmica (Figura 30 D, E y G). A partir de la protodermis se generan estructuras embriogénicas mediante embriogénesis recurrente, que mostraron una fuerte señal de hibridación (Figura 12 E). A medida que se inicia la polarización del embrión, la expresión se localizó en las células meristemáticas que constituirán el polo apical y el polo radicular del embrión (Figura 30 F). En los estadios de transición de estado globular a corazón, se detectó una abundante acumulación del transcrito en cotiledones incipientes así como en el MA (Figura 30 I). En los estadios torpedo y cotiledonar, la expresión se localizó preferencialmente en la protodermis, las capas corticales más externas de los embriones, en el polo radicular así como en el MA, y región axilar de los cotiledones (Figura 30 J, K, L, M y N). También se observó una señal intensa en las estructuras embriogénicas y embriones globulares que se originaron mediante embriogénesis secundaria en el hipocótilo de los embriones (Figura 30 J).

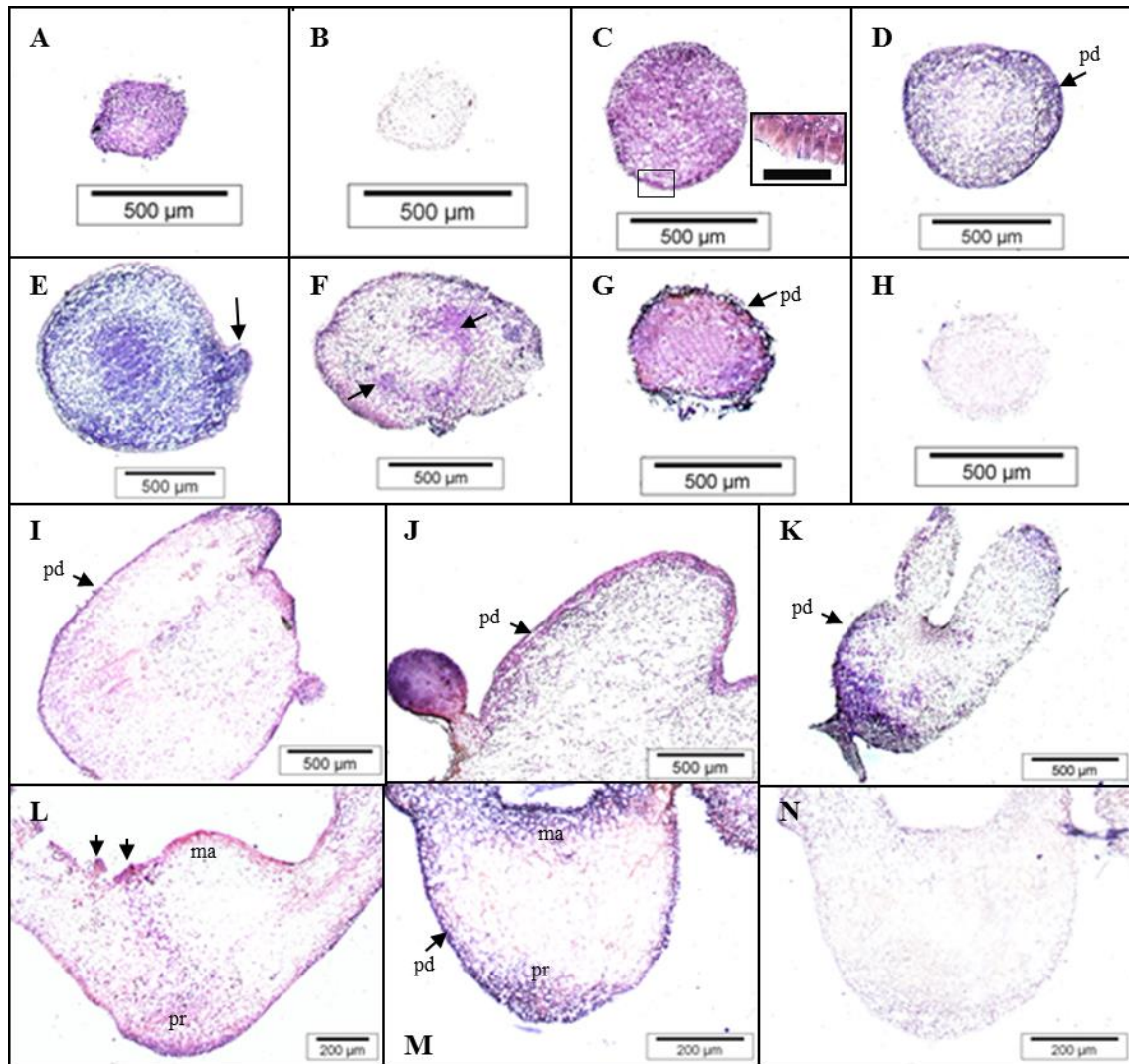


Figura 30.- Localización *in situ* del transcrito *QrCPE* en secciones longitudinales de embriones somáticos de roble de las líneas Sainza (A, B, C, D, E, F, I, J y L) y B-17 (G, H, K, M y N). Las secciones se hibridaron con la sonda específica antisentido (A, C, D, E, F, G, I, J, K, L y M) y con la sonda sentido (B, H y N) apreciándose en estas últimas la ausencia de señal. Se muestran embriones en estadio preglobular (A y B), globular temprano mostrando divisiones celulares en la protodermis (C), embriones globulares con una protodermis claramente diferenciada (D, E, G y H) y estadio de transición de globular a oblongo (F) mostrando áreas meristemáticas polarizadas (flechas). La flecha en E indica una estructura proembriónica. Se pueden observar también embriones en estadio corazón (I), corazón-torpedo (J), torpedo (K) y cotiledonar (L, M y N). En la sección J se aprecia un embrión globular originado por embriogénesis secundaria en la zona del hipocótilo del embrión corazón-torpedo y las flechas en la imagen L indican la expresión en la región axilar de los cotiledones. ma (meristemo apical); pr (polo radicular); pd (protodermis).

El análisis de los embriones cotiledonares de la línea Sainza en estadios de desarrollo más avanzados mostró que el transcrito *QrCPE* era más abundantes en el polo radicular que en MA, con localización específica en las células precursoras de la caliptra y columela (Figura 31 A y B). En el caso de los embriones cotiledonares del genotipo B17, se observó una mayor acumulación del transcrito en el MA (Figura 31 E, F y H), aunque también se detecta expresión en las capas celulares subprotodérmicas en el polo radicular, precursoras de la caliptra (Figura

31 H e I). También se observó ligera expresión en las células precursoras del tejido fundamental (Figura 31 E).

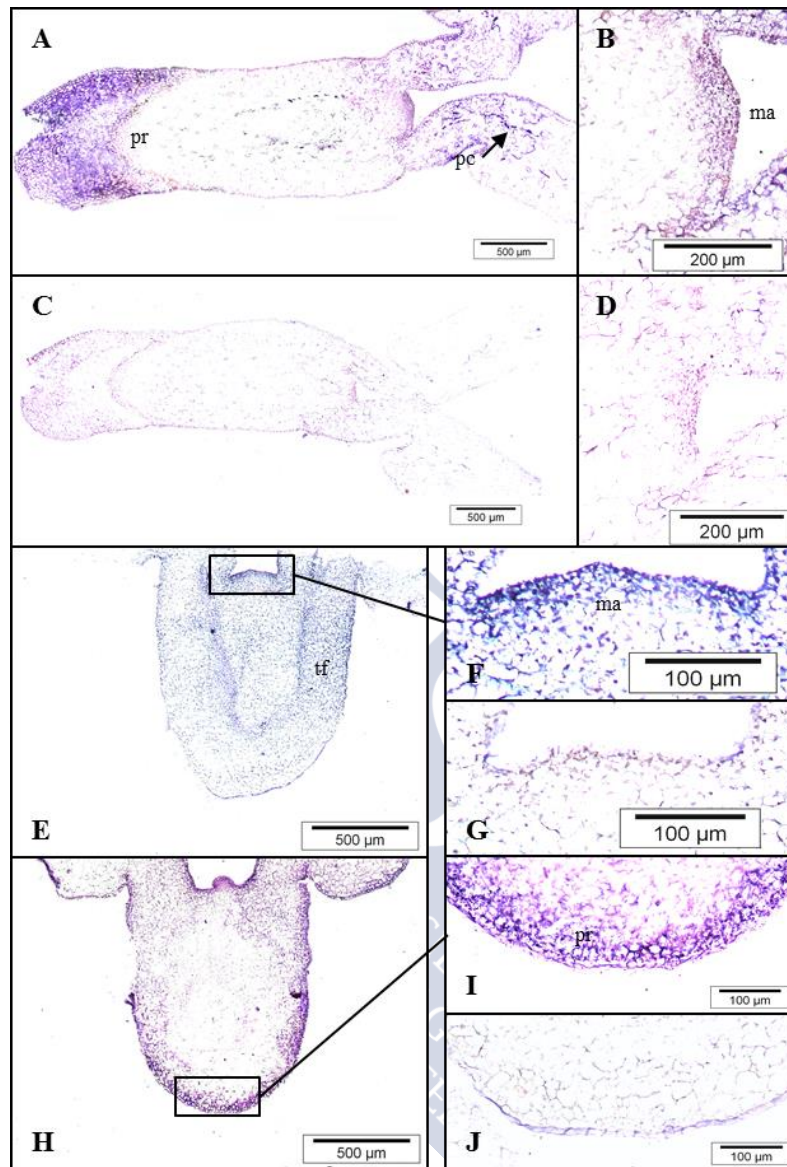


Figura 31.- Localización *in situ* del ARNm del gen *QrCPE* en secciones de embriones somáticos, en estado cotiledonar avanzado, de las líneas Sainza (A-D) y B-17 (E-J) de roble hibridadas con la sonda específica antisentido (A, B, E, F, H e I) y la sonda sentido o control (C, D, G y J). En las imágenes B, D y G se muestran secciones más ampliadas del MA de los embriones A, C y E respectivamente y en I se muestra una magnificación del polo radicular del embrión H. En las secciones control, hibridadas con la sonda sentido, no se observó señal. ma (meristemo apical); pr (polo radicular); tf (tejido fundamental).

5.2.3.3.2.3 *Alcornoque*

Con objeto de ampliar el estudio de este gen a otra fagácea también se analizó la expresión del gen *QsCPE* durante el desarrollo de embriones somáticos en una línea embriogénica de alcornoque denominada Qs3. Se detectó una expresión abundante y uniforme en todas las células de los embriones globulares con una acumulación preferencial en la protodermis (Figura

32 A). En embriones en un estadio globular más avanzado, la expresión es más abundante en la protodermis (Figura 32 B, flechas). En los embriones en estado torpeda, la señal se localizó en la protodermis y el polo radicular (Figura 32 D). A medida que los embriones se van desarrollando, ya en estado cotiledonar, la acumulación del transcrito se localizó en la protodermis y capas subprotodérmicas, en el polo radicular abarcando las células precursoras de la caliptra y columela y en el MA incluyendo la zona axilar de los cotiledones (Figura 32 F, H, I y J).

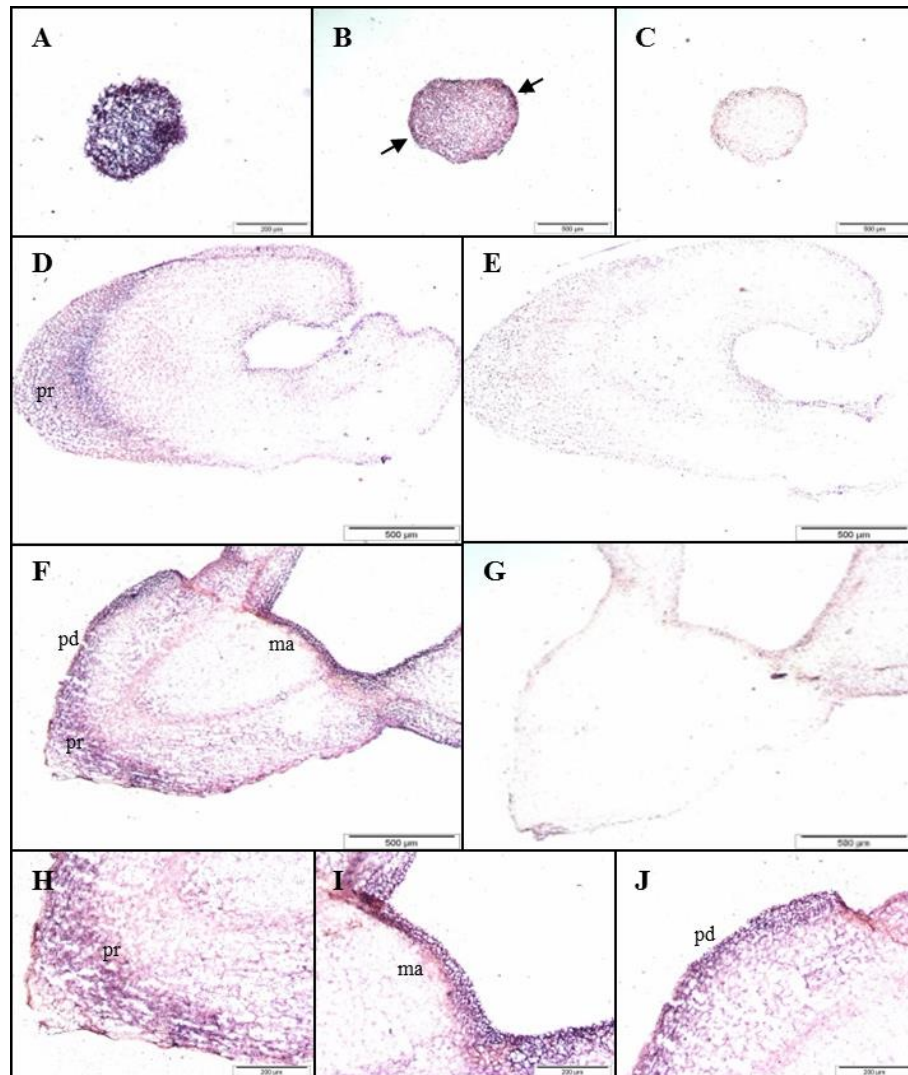


Figura 32.- Localización *in situ* del ARNm del gen *QsCPE* en secciones longitudinales de embriones somáticos de *Q. suber* en estadios preglobular (A), globular (B y C), torpeda (D y E) y cotiledonar (F, G, H, I y J), hibridados con la sonda específica antisentido (A, B, D, F, H, I y J) y sentido o control (C, E, G). En las secciones H, I y J se muestran ampliaciones del polo radicular, MA y protodermis respectivamente del embrión mostrado en F. Se puede apreciar la ausencia de señal en los controles. ma (meristemo apical); pr (polo radicular); pd (protodermis); tf (tejido fundamental).

El análisis de los embriones en un estadio cotiledonar más avanzado mostró que la expresión de *QsCPE* se localizaba en el MA y zona axilar de los cotiledones (Figura 33 A, B y G). En el polo

radicular, el transcrito se localiza en las células iniciales del tejido fundamental y de la columela (Figura 33 A y C) así como en las células derivadas de estas (Figura 33 A y G). En los proembriones que emergen del hipocótilo de embriones cotiledonares mediante embriogénesis recurrente, se detectó una intensa expresión del gen (Figura 33 G y H, flechas).

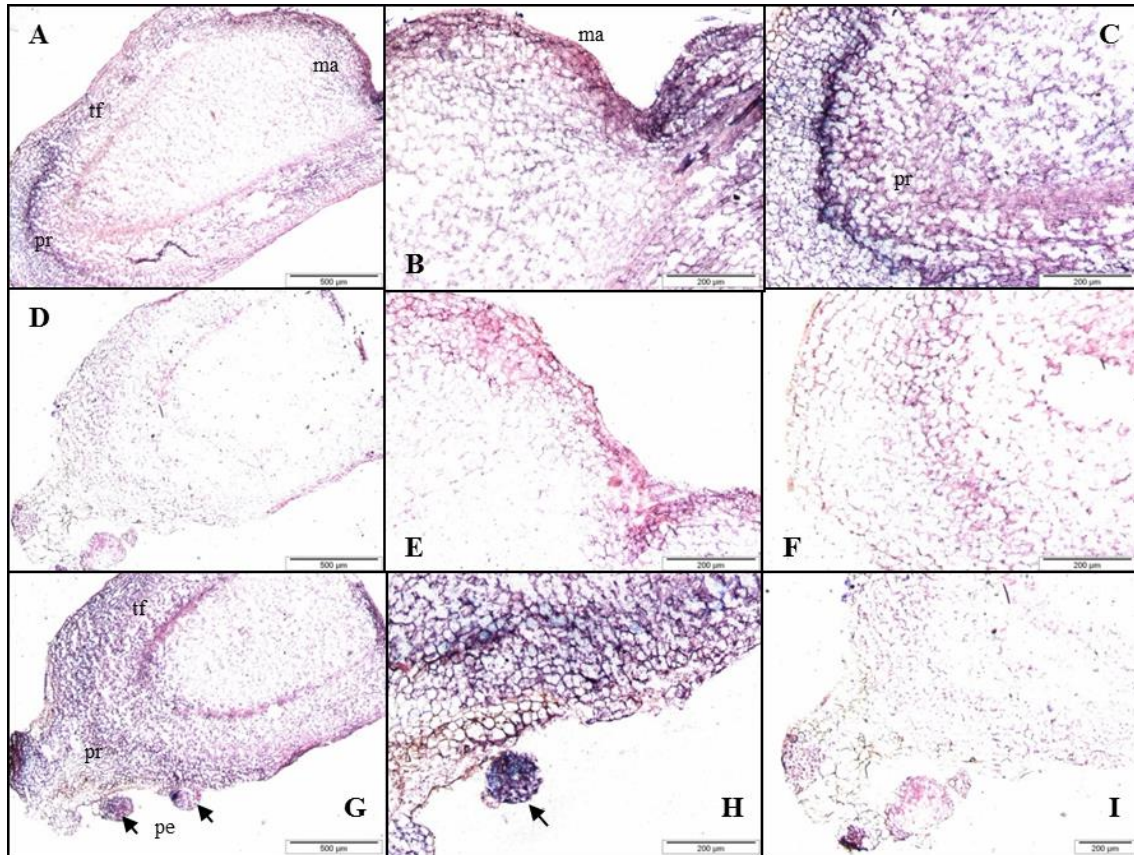


Figura 33.- Localización *in situ* del transcrito *QsCPE* en embriones cotiledonares en un estado de desarrollo más avanzado. Las secciones fueron hibridadas con la sonda específica de *QsCPE* antisentido (A, B, C, G, H) y con la sonda sentido o control (D, E, F, I). En las secciones B y E se muestran ampliaciones del MA de los embriones A y D respectivamente. En las imágenes C, F e I se muestran secciones magnificadas del polo radicular de los embriones A, D y G respectivamente. En las secciones G y H se aprecian proembriones (flechas) originados en el hipocótilo del embrión por embriogénesis secundaria. Nótese la ausencia de señal en los controles. pr (polo radicular); pd (protodermis); pe proembrión; tf (tejido fundamental).

La localización de la expresión del gen *CPE* durante el desarrollo de los embriones somáticos de castaño, roble y alcornoque mostró un patrón similar en las tres especies: elevada expresión en estructuras proembriogénicas y embriones globulares con una acumulación preferencial en su protodermis. A medida que aumenta la histodiferenciación de los embriones, el transcrito se localiza en las capas externas del MA y en el polo radicular con localización preferencial en las células precursoras del tejido fundamental y la columela.

5.2.4 **Análisis de la expresión del gen CPE en tejidos postembrionarios mediante hibridación *in situ***

Para completar el estudio, se llevó a cabo la localización de la expresión de *QrCPE* durante el desarrollo de la raíz primaria de plántulas de roble obtenidas mediante germinación de los embriones somáticos del genotipo Sainza y en ápices y RA de brotes en multiplicación de castaño de la línea P2Rb. En alcornoque, también se analizó el patrón de expresión en la parte apical de brotes establecidos a partir del mismo árbol adulto que los embriones somáticos y mantenidos en proliferación mediante propagación de yemas axilares, así como en el ápice de la raíz desarrollada a partir de esos brotes.

5.2.4.1 **Expresión del gen CPE durante el desarrollo de la raíz de roble**

Durante el desarrollo de la raíz de roble, se observó una intensa señal de hibridación en la zona de división celular activa de la raíz, prácticamente ausente en la región madura de la raíz (Figura 34 A). En la zona de elongación, se detectó una señal moderada en las células de la endodermis, sin localización del transcrito en los tejidos vasculares y las células del parénquima cortical (Figura 34 B). En la zona de división celular se observó una elevada expresión en el meristemo fundamental y no se detectó señal de hibridación en la región central del MAR, donde se localiza el CQ (Figura 34 A y D). Se detectaron altos niveles de transcrito de *QrCPE* en la columela (Figura 34 F) que disminuyen hacia las capas más externas de la caliptra, donde tiene lugar el desprendimiento de las células más externas en las que se observa señal (Figura 34 A).

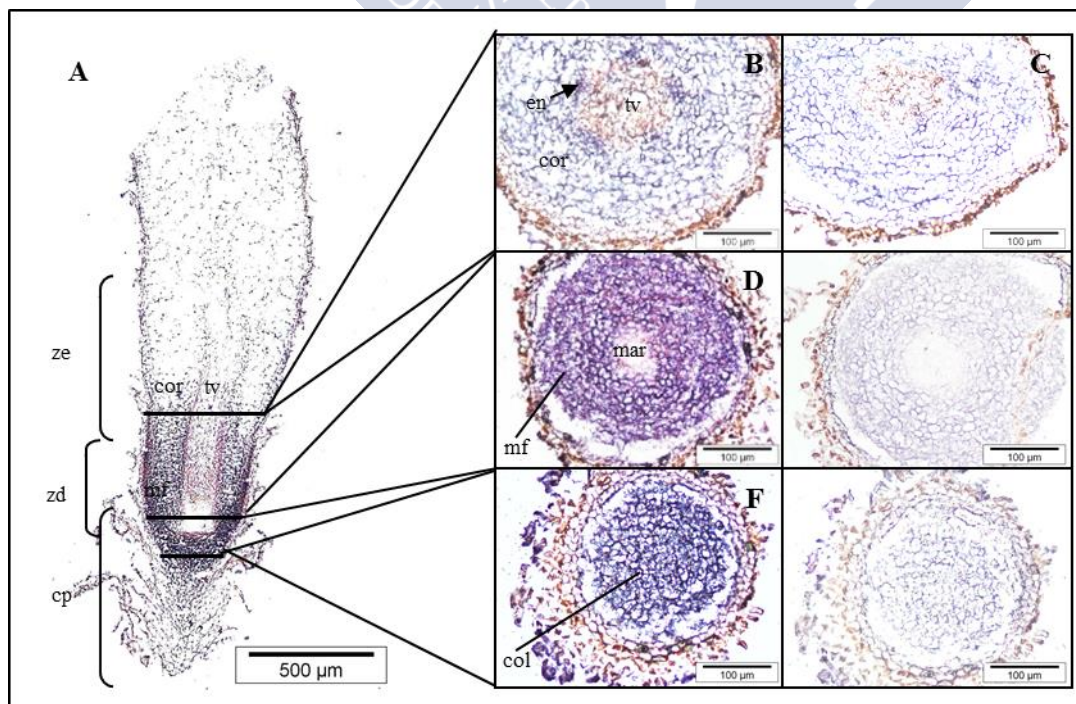


Figura 34.- Localización *in situ* del ARNm del gen *QrCPE* en secciones longitudinal (A) y transversales (B, C, D, E, F y G) de la parte apical de raíz primaria de una plántula obtenida mediante germinación de embriones somáticos

Sainza de roble. Las secciones se hibridaron con la sonda específica antisentido (A, B, D y F) y sentido (C, E y G), pudiendo apreciarse en estas últimas la ausencia de señal. En la sección A se aprecian las zonas de elongación, de división y la caliptra. Se observa ausencia de señal en los controles. cp (caliptra); col (columela); cor (cortex); en (endodermis); mar (meristemo apical de la raíz); mf (meristemo fundamental); tv (tejidos vasculares); ze (zona de elongación); zd (zona de división).

5.2.4.2 Expresión del gen *CPE* en brotes y raíces adventicias de castaño

El análisis de la expresión del gen *CPE* en el ápice de brotes en multiplicación de castaño mostró una localización del transcrito en la protodermis y el meristemo fundamental, así como en la zona adaxial de los primordios foliares, especialmente en la zona de crecimiento de los mismos (Figura 35 A, B, C, D). En la zona de elongación de los ápices la expresión se extiende a la epidermis y el tejido fundamental (Figura 35 A y D). En el MAB y yemas axilares el transcrito se localizó en la capa más externa con un patrón de expresión similar en ambos tejidos (Figura 35 B, C, E y F). También se analizó la expresión del gen en raíces, mostrando una abundante expresión en los meristemos de RL originadas a partir del periciclo (Figura 35 G y H).

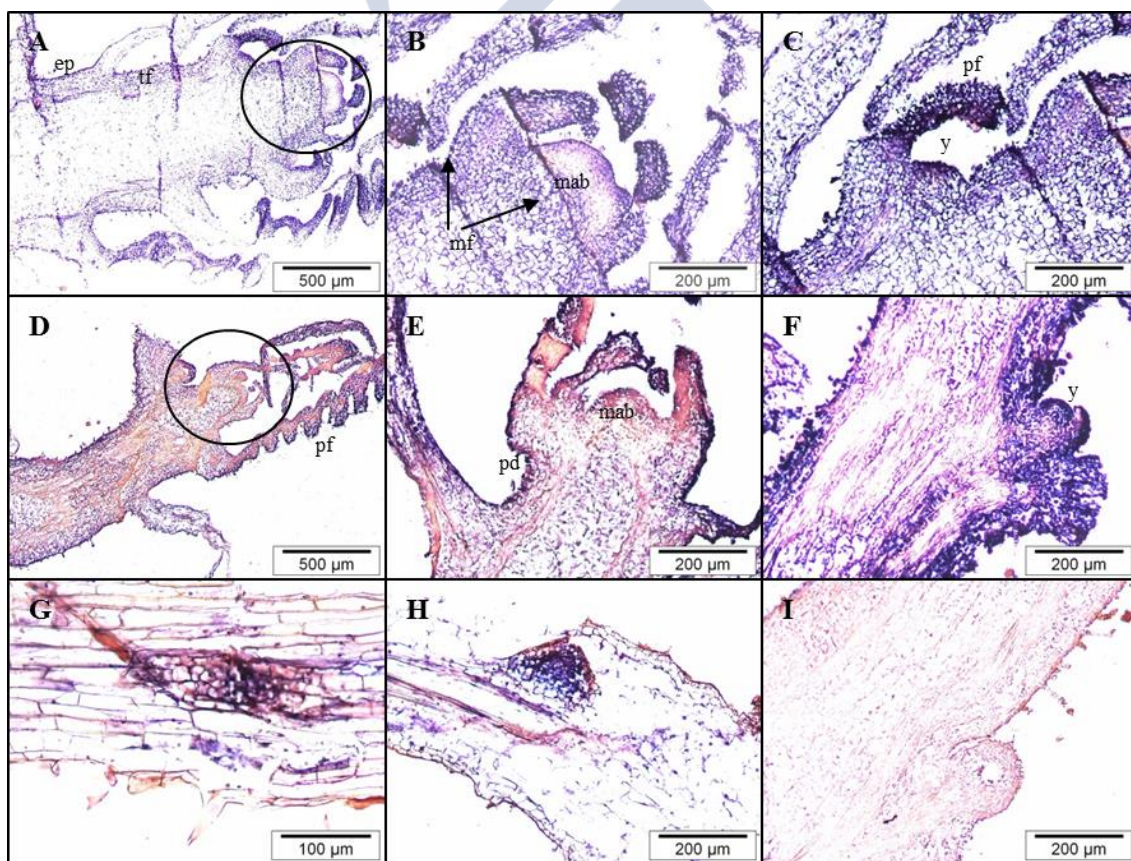


Figura 35.- Localización *in situ* del ARNm del gen *CsCPE* en secciones longitudinales de la parte apical del brote (A, B, C, D, E, F e I) y de la zona de maduración de la raíz, mostrando el desarrollo de RLs (G y H), procedentes de brotes de castaño e hibridadas con la sonda específica antisentido (A, B, C, D, E, F, G y H) y sentido o control (I). Nótese la ausencia de señal en los controles. ep (epidermis); mab (meristemo apical del brote); mf (meristemo fundamental); pd (protodermis); pf (primordio foliar); tf (tejido fundamental); y (yema).

5.2.4.3 Expresión del gen *CPE* en brotes de alcornoque

Finalmente, el análisis de la expresión del gen en tejidos aéreos se realizó en brotes en multiplicación de alcornoque, utilizando como sondas las obtenidas a partir del gen *QsCPE*. En los ápices de los brotes, el transcrito *QsCPE* se localizó en la protodermis, meristemo fundamental y yemas axilares, así como en los primordios foliares, especialmente en la zona de crecimiento de los mismos, y la capa más externa del MAB (Figura 36 A y B). También se analizó la expresión del gen en la zona apical de RA inducidas en los brotes mantenidos *in vitro*. En dichas raíces, el transcrito se localizó en el MAR con localización en las células iniciales del tejido fundamental y la columela, aunque menos intensamente que en el caso de la raíz primaria de *Q. robur* (Figura 36 D, E y F).

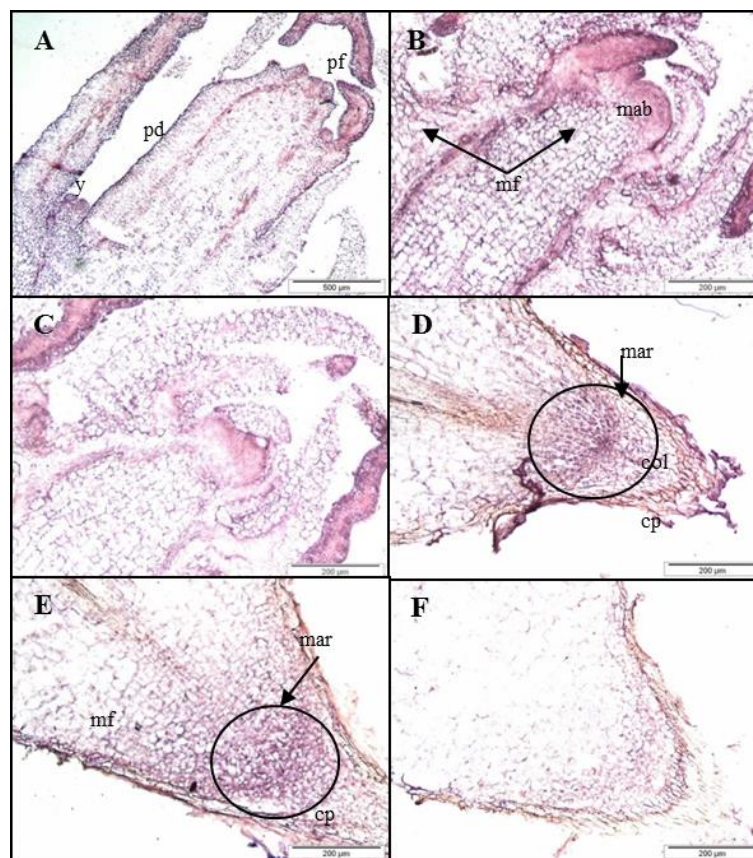


Figura 36.- Localización *in situ* del ARNm del gen *QsCPE* en secciones longitudinales de la parte apical del brote (A, B y C) y de la parte apical de raíz (D, E y F) de brotes de alcornoque multiplicados *in vitro* e hibridadas con la sonda específica antisentido (A, B, D y E) y sentido o control (C y F). Nótese la ausencia de señal en los controles. cp (caliptra); col (columela); ep (epidermis); mar (meristemo apical de la raíz); mf (meristemo fundamental); pc (procambium); hv (haces vasculares).

5.3 Discusión

La implicación de las proteínas GRPs en diferentes procesos ha sido previamente documentada en plantas (Mangeon *et al.*, 2010). En el caso de Fagáceas, en nuestro laboratorio se había

aislado el gen *QrCPE* en roble, que presentaba una expresión diferencial a lo largo del desarrollo (Gil *et al.*, 2003), y el gen *CsCPE* a partir de embriones somáticos de castaño (Vielba *et al.*, 2008). En el presente estudio, se ha aislado la parte codificante del gen *CPE* en 52 especies de diferentes familias, herbáceas y leñosas, incluyendo angiospermas (monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas y helechos. Los análisis de secuencia indicaron que estos genes guardan un 97% de homología con los aislados en roble y castaño (Gil *et al.*, 2003; Vielba *et al.*, 2008). El análisis de las proteínas CPE predichas a partir de cada región codificante reveló que son proteínas ricas en residuos de glicina e histidina con elevada homología con varias proteínas GRP sobretudo a nivel de PS N-terminal. Estas proteínas están sumamente conservadas evolutivamente, lo que parece indicar su posible importancia en procesos esenciales de plantas. A pesar de que angiospermas y gimnospermas han divergido evolutivamente hace más de 150 millones de años, en este estudio apenas hemos observado diferencias entre las secuencias analizadas. En un estudio realizado comparando gimnospermas con angiospermas se ha visto que el número de exones e intrones de genes homólogos está bien conservado entre especies distantes filogenéticamente (Sena *et al.*, 2014).

La presencia de una secuencia señal para el transporte y posterior procesamiento de la proteína CPE, su homología con proteínas GRP de pared celular como StTLRP (Kloosterman *et al.*, 2010) y BhGRP1 implicada en el mantenimiento de la pared celular y su reparación durante la deshidratación y rehidratación en *B. hygrometrica* (Wang *et al.*, 2009), junto con los resultados de localización subcelular que predicen una localización extracelular o de pared celular parecen indicar que CPE está dirigida a la pared celular. De acuerdo con la clasificación de Mangeon *et al.* (2010), la presencia de un PS en la proteína CPE seguido de una región rica en glicina con disposición GXGX, la ausencia de otros dominios conservados presentes en algunas proteínas GRPs y la distribución de la proteína en el análisis filogenético en el clado de las GRPs de la clase V BhGRP1 (Wang *et al.*, 2009) parece indicar que la proteína CPE pertenece a la clase V de las GRPs. Las proteínas de esta clase fueron identificadas en eucalipto y también están presentes en *Arabidopsis* y arroz y son GRPs con un elevado contenido de glicina pero con patrones de repeticiones mezclados (Bocca *et al.*, 2005; Mangeon *et al.*, 2010).

En base a la elevada expresión de *QrCPE*, detectada por Northern blot, en embriones zigóticos y somáticos (Gil *et al.*, 2003), se procedió a un estudio en detalle de su expresión con el objeto de corroborar la posible implicación del gen *CPE* en estos procesos morfogénicos. En primer lugar, la expresión diferencial del gen *CsCPE* durante el desarrollo de los embriones zigóticos de castaño, pone de manifiesto su implicación en este proceso. Además, la localización del transcrito, asociada primero a etapas muy tempranas del embrión y posteriormente en tejidos relacionados con los meristemos apical y radicular, indica que el gen está regulado a nivel de

desarrollo. La polarización de la expresión en ambos meristemos, sugiere que pueda estar participando en la determinación y/o mantenimiento de los mismos. En general, la expresión de genes que codifican GRPs es específica de tejido y está regulada durante el desarrollo de la planta, así como bajo la influencia de varios estímulos externos (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). La secuencia de CPE mostró homología con otras GRPs involucradas en procesos de desarrollo, como el precursor de la proteína PsGRP1 de *P. sativum* cuya expresión se induce por ácido abscísico (ABA) durante el desarrollo de la semilla, la senescencia del pistilo y el estrés osmótico (Urbez *et al.*, 2006). Otra proteína de *P. sativum* asociada con procesos de desarrollo en planta, que presenta homología con CPE, es la proteína PsDRM2, cuya secuencia génica se aisló a partir de yemas en estado de dormición y es similar a las proteínas GRPA y CORA de alfalfa (Stafstrom *et al.*, 1998). Además, CPE también muestra homología con la proteína CYC02_CATRO que se expresa preferentemente en el límite G1/S durante el ciclo celular en cultivos celulares sincrónicos de *Catharanthus roseus* (Kodama *et al.*, 1991).

Para profundizar en el papel del gen CPE en procesos de diferenciación y desarrollo, también se evaluó su expresión tanto durante la inducción de la ES, como durante la histodiferenciación de los embriones somáticos secundarios. Los elevados niveles de expresión de *QrCPE* en los agregados celulares y estructuras nodulares inducidas en los explantos iniciales de hojas y la falta de señal en las células parenquimáticas que rodean estos agregados indica que la transcripción está asociada con los primeros estadios de los embriones somáticos y que el gen puede estar implicado en la etapa de inducción, participando en el proceso de dediferenciación y adquisición de un nuevo programa de desarrollo. Varios genes que codifican para GRPs están asociados con el desarrollo temprano de la ES (Sato *et al.*, 1995; Magioli *et al.*, 2001). La proteína CPE mostró homología a nivel de la secuencia de aminoácidos con dos GRPs codificadas por dos ADNc que fueron aislados a partir de suspensiones celulares de *D. carota* durante la inducción de ES: DC7.1 que se expresa transitoriamente durante las fases iniciales de la inducción de la embriogénesis y DC9.1, que experimenta un descenso en la expresión tras la inducción de ES en cultivos celulares de zanahoria en medio libre de auxina (Aleith y Richter, 1990). Además, en el análisis que hemos realizado, la secuencia de aminoácidos de CPE presenta elevada homología con otras proteínas ricas en glicina de varias especies, como GRPs implicadas en procesos de regeneración, como la identificada en *P. dulcis* que se expresa en los estadios tardíos de la regeneración de brotes adventicios y está implicada en transporte celular (Santos *et al.*, 2009). Así mismo, CPE muestra homología con proteínas relacionadas con respuesta a factores abióticos, como GRP HC1 de *Oxybasis rubra* inducida por la luz (Kaldenhoff y Richter, 1989), con proteínas CORA-like como la de *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* y *M. domestica* que se expresan en respuesta a temperaturas frías, sequía y ABA (Luo *et al.*, 1991; Laberge *et al.*, 1993) o con la proteína JCGZ de *J. curcas* deducida a partir un gen

aislado en plántulas sometidas a sequía (Zhang *et al.*, 2015). Todo ello apunta a que, como se propuso para otras GRPs (Kar *et al.*, 2012), el gen *CPE* esté regulado por factores abióticos como ocurre durante la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos. En el análisis transcriptómico realizado recientemente durante la inducción con sacarosa de embriones somáticos en *Cinnamomum camphora*, muchos de los genes que se expresaban diferencialmente correspondían a genes de respuesta a estrés y a estímulos (Shi *et al.*, 2016). Concretamente en este trabajo, el gen *GRPIA* que codifica una proteína rica en glicina de unión a ARN, está entre los que más se expresa tanto en la librería de embriones somáticos como en la obtenida durante la inducción de embriones somáticos con sacarosa a partir de embriones zigóticos inmaduros.

El análisis realizado mediante qPCR durante el desarrollo de los embriones somáticos de castaño, reveló una expresión diferencial del gen durante los distintos estadios del desarrollo embrionario, lo cual indica un posible papel del gen *CPE* en el desarrollo de dichos embriones. Los niveles de expresión relativa más bajos fueron detectados en embriones torpedo, en coincidencia con los resultados obtenidos en el análisis realizado mediante Northern blot por Vielba *et al.* (2008). La menor expresión en los embriones torpedo se visualizó también en el análisis de hibridación *in situ*, con una polarización de la señal en el polo radicular de estos embriones. Por otra parte, el incremento de los niveles de expresión detectados en embriones cotiledonares con respecto a los embriones torpedo corresponde al momento en el que ambos meristemos están más definidos. Además, la elevada expresión detectada en estructuras proembrionógicas durante la fase de inducción de embriones, en contraposición con la ausencia de señal en las células parenquimáticas que rodean a esas estructuras y la ausencia de señal de *CPE* en callos no embriogénicos de roble en proliferación (Valladares *et al.*, 2013), indica que la expresión no está relacionada únicamente con proliferación, sino que le atribuye un papel relevante al gen durante la inducción y desarrollo de embriones somáticos. De manera similar, cuatro genes de zanahoria que codifican para GRPs se expresaban abundantemente en todos los estadios de los embriones somáticos, pero mostraban expresión relativamente baja en suspensiones de células de callo antes de la inducción de los embriones somáticos (Lin *et al.*, 1996). La abundante expresión detectada en los proembriones y estructuras proembrionógicas originados por embriogénesis secundaria en embriones de diferentes estadios en las tres especies analizadas, apunta a un papel importante del gen en estadios tempranos del desarrollo embrionario.

Las diferencias de expresión relativa encontradas en las tres líneas analizadas de castaño, indican que la expresión del gen está afectada por el genotipo. Los análisis realizados mediante hibridación *in situ* en las dos líneas embriogénicas de roble también ponen de manifiesto estas diferencias genotípicas. Trabajos previos realizados mostraron una respuesta diferente de estas

líneas en términos de proliferación, maduración y germinación (Corredoira y Vieitez, 2006; Valladares *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008). Por lo tanto, los diferentes niveles de expresión del gen *QrCPE* en esas líneas embriogénicas, así como la mayor acumulación del transcrito *QrCPE* en la protodermis de los embriones torpedo y en el hipocótilo de los embriones germinados del genotipo Sainza que en los de la línea B17 (Valladares *et al.*, 2013), puede estar relacionado con su diferente capacidad de embriogénesis recurrente. De forma similar, las pequeñas diferencias encontradas a nivel de expresión y localización del gen *CPE* en las tres especies analizadas pudieran ser atribuidas a diferencias en sus capacidades morfogénicas.

Por otra parte, se cree que las proteínas GRPs interactúan con otras proteínas y/o moléculas desempeñando un papel en señalización célula-célula por medio de estas interacciones (Fusaro y Sachetto-Martins, 2007). La implicación de GRPs en los eventos de señalización se propuso al sugerirse que la interacción de WAK1 con AtGRP2 regula la función de WAK1 en las respuestas de interacción planta-patógeno (Park *et al.*, 2001). El posible papel de las GRPs en las interacciones planta-microbio y mecanismos de defensa de plantas también se propuso en otros estudios (Mangeon *et al.*, 2010). En el caso de CPE, muestra una similitud significativa con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos ADNc (*AgNt84* y *ag164*), aislados de nódulos de raíz de *A. glutinosa* que codifican para dos putativas proteínas ricas en residuos de glicina e histidina y se expresan en las primeras etapas del desarrollo de los nódulos de raíz infectada con *Frankia hyphae* (Pawlowski *et al.*, 1997). Además, la proteína de vid denominada PCr (Phase change-related), que inhibe el crecimiento del micelio de *Armillaria mellea in vitro*, y por lo tanto puede jugar un importante papel en respuestas de defensa en la vid (Perazzolli *et al.*, 2010), mostró una elevada homología con CPE. Entre las proteínas relacionadas con defensa y con las que CPE presenta homología, también se encuentra el péptido antimicrobiano rico en residuos de glicina e histidina shep-GRP de *Capsella bursa-pastoris* aislado a partir de raíces y que puede estar implicado en la protección de la raíz (Park *et al.*, 2000), con una proteína de *S. tuberosum* inducida por *Ralstonia solanacearum*, así como con una proteína rica en glicina de *C. sativus* que está involucrada en interacciones patógeno-hospedador. Por lo tanto no se puede descartar un posible papel del gen *CPE* en los mecanismos de defensa de la planta. Varias proteínas relacionadas con patogénesis y genes con papeles en las respuestas de defensa también se expresan durante la embriogénesis, lo que sugiere que pueden jugar un papel en ambos procesos de desarrollo y defensa vegetal (Helleboid *et al.*, 2000a, 2000b). En este sentido, cabe mencionar que los análisis de expresión llevados a cabo en nuestro laboratorio, durante la infección de brotes de castaño con *Phytophthora cinnamomi*, indican un papel del gen *CsCPE* en la respuesta a la infección (datos no mostrados). Varios genes expresados diferencialmente entre embriones zigóticos y somáticos, están implicados en interacción planta-patógeno (Shi *et al.*, 2016).

Los análisis mediante hibridación *in situ* durante el desarrollo embrionario de las líneas embriogénicas de castaño, roble y alcornoque, ponen de manifiesto, independientemente del origen de los embriones somáticos (primarios o secundarios) y del genotipo o la especie, una elevada expresión en células embriogénicas en división activa. También, en todas las líneas, la expresión es abundante en estadios tempranos de desarrollo y a medida que progresa el desarrollo de los embriones y presentan una protodermis claramente diferenciada, la señal más intensa se localiza en células de la protodermis en división activa, a partir de donde se originan directamente los nuevos embriones mediante embriogénesis secundaria, confirmando nuevamente la implicación del gen en el proceso de iniciación así como en el mantenimiento de la capacidad embriogénica. La protodermis es un tejido con gran habilidad embriogénica, como se muestra durante la formación de los embriones somáticos a través de un patrón directo de desarrollo (Kurczyńska *et al.*, 2007; Vieitez *et al.*, 2012). En este sentido, cabe señalar la alta actividad de promotor de AtGRP5 en tejidos derivados de protodermis en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Sachetto-Martins, 1995) y en áreas periféricas específicas de los tejidos de callo embriogénico originados durante la ES secundaria (Magioli *et al.*, 2001).

La distribución espacial de *CPE* cambia durante el desarrollo de los embriones somáticos, de una expresión uniforme en agregados proembriogénicos y en embriones tempranos globulares a una localización específica en áreas que experimentan divisiones celulares en diferentes estadios del desarrollo del embrión, lo que indica que la expresión de *CPE* está asociada con células en división activa que parecen estar en condición meristemática. Los transcritos *CPE* se localizaron abundantemente en la región apical de la raíz primaria, especialmente en la zona de división de la raíz y en la caliptra. De manera similar, se sugirió que tres genes *GRP* de maíz que muestran patrones específicos de tejido restringidos al ápice de la raíz participan a través de una acción cooperativa en su desarrollo (Woll *et al.*, 2006). Por otra parte, AtGRP3 está implicada en la determinación del tamaño de la raíz durante el desarrollo y los mutantes en este gen presentan división celular y elongación anormal (Mangeon *et al.*, 2016). Aunque *CPE* no es un gen específico de raíz, la expresión localizada de *CPE* en las putativas células iniciales de la caliptra (localizadas bajo el CQ) de los embriones cotiledonares también sugiere un papel para *CPE* en la especificación del destino de esas células.

El patrón de expresión a nivel tisular y durante el desarrollo es bastante similar en embriones somáticos y zigóticos, sin embargo, cabe mencionar algunas diferencias observadas en el patrón de expresión de *CPE*, tales como la mayor expresión del gen en la zona apical del embrión globular zigótico, que pudiera estar asociado a un mejor desarrollo programado para la germinación. En general es conocida la baja tasa de conversión en planta a partir de embriones somáticos en muchas especies recalcitrantes, y que suele ser dependiente del genotipo

(Maximova *et al.*, 2014). La mayor localización del gen en las células iniciales de la caliptra, especialmente en embriones somáticos de roble y alcornoque, puede ser un efecto genotípico o bien estar asociada a una diferente capacidad de las líneas para el desarrollo de la raíz.

En tejidos post-embrionarios como yemas, ápices de brotes y raíces, el transcrito *CPE* se localizó en tejidos con una elevada actividad de división celular. Del mismo modo, la expresión preferencial de *AtGRP2* está asociada a tejidos que están en división celular activa, como embriones y ápices de raíz (Fusaro *et al.*, 2007). Un patrón similar, asociado a tejidos que normalmente poseen una elevada actividad de división celular como ápices de brotes, yemas florales y embriones en estadios tempranos en *A. thaliana* fue descrito para *AtCSPs* (Nakaminami *et al.*, 2009). Por otra parte, la sobreexpresión de la proteína rica en glicina *AtCSP4* afecta a etapas tardías del desarrollo del embrión en *A. thaliana* (Yang y Karlson, 2011).

En conclusión, los resultados muestran que la proteína *CPE* pertenece a la clase V de la familia de proteínas GRPs y que el gen *CPE*, aunque no es específico del desarrollo embrionario, presenta una expresión asociada con la iniciación de los embriones somáticos, lo que sugiere que el gen juega un papel en la adquisición y mantenimiento de la competencia embriogénica. El patrón de expresión de *CPE* cambia durante las fases de transición de los embriones zigóticos y somáticos de una manera regulada por el desarrollo, lo que indica que el gen está implicado en el desarrollo del embrión. Más estudios de la respuesta a diferentes estreses, infección de patógenos, localización de proteína y análisis funcionales por transformación genética nos ayudarán a clarificar las funciones del gen. Por otra parte, la presunta implicación del gen *CPE* en la germinación, cuello de botella de la embriogénesis somática, abre la posibilidad de transformar las líneas embriogénicas de roble con el gen, para evaluar si su tasa de conversión en planta se ve afectada.







6. Gen *SCL1* (*Scarecrow-like 1*)

6.1 Introducción

6.1.1 Familia gras

Las proteínas GRAS forman una gran familia específica de plantas identificada en más de 300 especies (Sun *et al.*, 2012) y su nombre deriva de los primeros miembros identificados, GIBERELLIN-ACID INSENSITIVE (GAI) (Peng *et al.*, 1997) REPRESSOR OF GAI (RGA) (Silverstone *et al.*, 1998) y SCARECROW (SCR) (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Las proteínas GRAS están implicadas en diferentes procesos de desarrollo y crecimiento vegetal, siendo especialmente importantes para la diferenciación celular y la formación de los límites de los órganos. Además, desempeñan papeles en numerosas vías de señalización de hormonas, luz y estrés. A menudo se les atribuyen cambios en la actividad transcripcional y aunque su papel directo como factores de transcripción no está realmente claro, se asocian con varias clases de factores de transcripción y factores de re-modelización de cromatina sugiriendo que son importantes reguladores de la transcripción (Bolle, 2016b).

Esta familia de proteínas está ampliamente distribuida en el reino vegetal y posiblemente emergió primero en bacterias (Zhang *et al.*, 2012). La familia GRAS está presente en todas las especies de plantas superiores y en plantas inferiores como *Selaginella moellendorffii* y *Physcomitrella patens* (Yasumura, 2007, Engstrom, 2011). También está presente al menos en un alga (*Spirogyra pratensis*), pero no se identificó ningún miembro en hongos o metazoos. El hecho de que no se encontraron proteínas GRAS en clorófitos sugiere que pudieran ser importantes para la adaptación al medio terrestre (Bolle, 2016a).

En plantas superiores, esta familia de genes comprende al menos a 30 miembros, pero algunas veces se expande a más de 100 miembros, como en el caso de árboles, por ejemplo en *Malus x domestica* (127 genes), *P. trichocarpa* (106 genes), *E. grandis* (94 genes) con algunas excepciones como *Citrus* (48-49) y *P. mume* (46) (Liu *et al* 2014; Lu *et al* 2015). El número de genes GRAS está relacionado con el tamaño del genoma y los eventos de duplicación en las especies (Song, 2014).

En plantas superiores se pueden discriminar hasta 15 clados de proteínas GRAS, que se nombran en base al miembro más destacado del clado, el cual, en la mayoría de los casos, se puede encontrar en todas las plantas incluido musgos (Figura 1). Los clados comunes son HAM, SCL26/NSP2, SCL4/7, LS, DELLA, SCR, SCL3, LISC, NSP1, SHR y PAT1 aunque existen otros que solo están presentes en algunas plantas. Los clados, que son específicos de ciertas

especies, y su expansión dependiendo de las especies sugieren que tuvo lugar una evolución adaptativa. Cada clado de plantas superiores también incluye plantas inferiores lo que apunta que la diversificación en diferentes clados tuvo lugar muy pronto en la evolución (Bolle, 2016a)

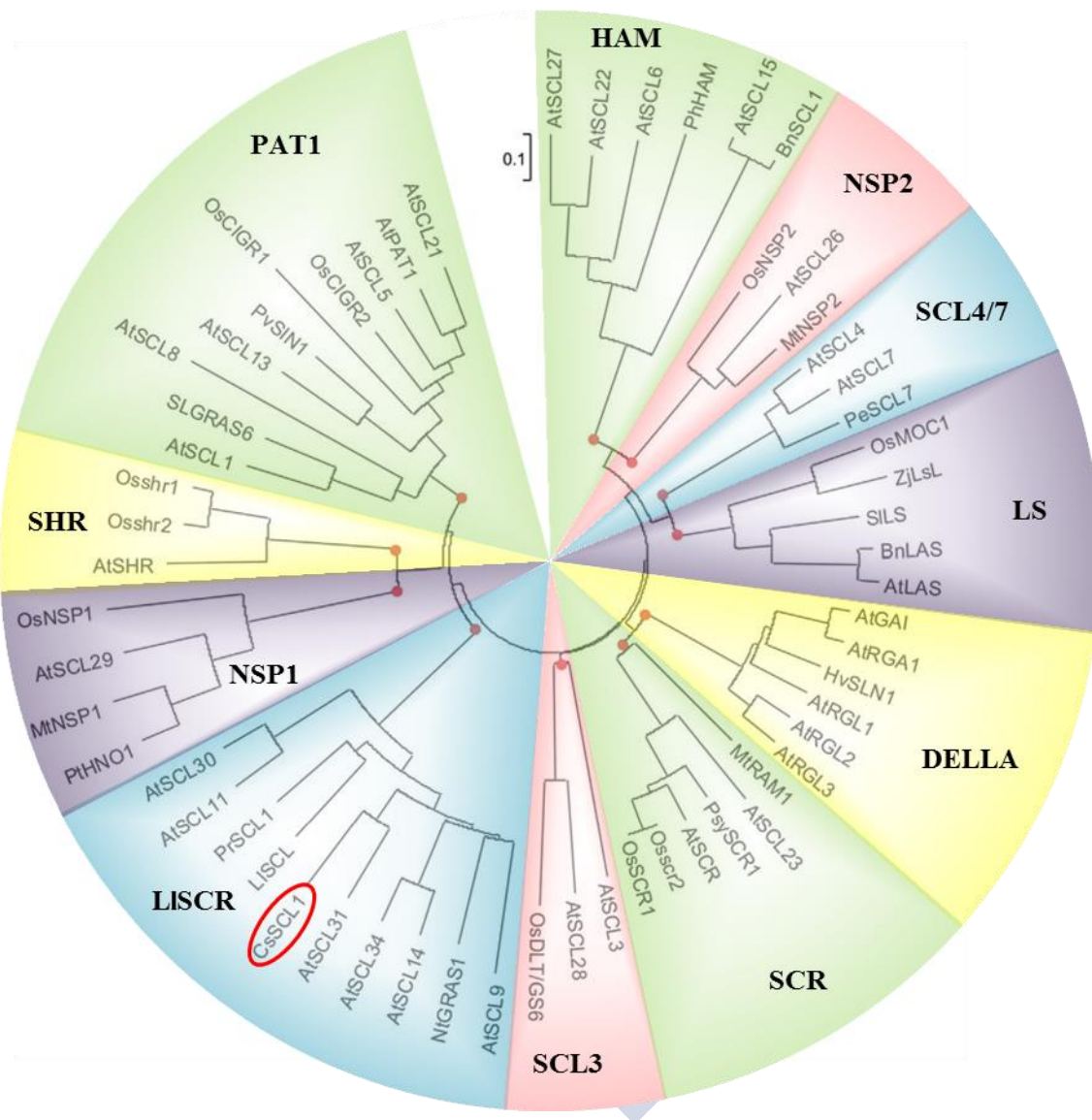


Figura 37.- Árbol filogenético para las proteínas GRAS. Los once clados principales se nombran en base al miembro más destacado del clado. At, *A. thaliana*; Bn, *B. napus*; Cs, *C. sativa*; Hv, *H. vulgare*; Ll, *Lilium longiflorum*; Mt, *Medicago truncatula*; Nt, *N. tabacum*; Os, *O. sativa*; Pe, *P. euphratica*; Ph, *Petunia* × *hybrida*; Pr, *P. radiata*; Psy, *P. sylvestris*; Pt, *P. trichocarpa*; Pv, *Phaseolus vulgare*; Sl, *S. lycopersicum*; Zj, *Zoysia japonica*. (Adaptado de Bolle *et al* 2016)

Las proteínas de la familia GRAS tienen un tamaño de 400-770 aminoácidos y presentan un extremo N-terminal altamente divergente y un extremo C-terminal conservado comúnmente conocido como dominio GRAS. El dominio N-terminal tiene una secuencia altamente variable incluyendo regiones intrínsecamente desordenadas, que les otorga su especificidad funcional (Uversky, 2010; Sun *et al.*, 2012). El dominio GRAS está típicamente compuesto por

aproximadamente 350 aminoácidos y contiene 5 motivos altamente conservados: LRI, VHIID, LRII, PFYRE y SAW (Figura 2). Los dos motivos de repetición de leucina (LRI y LRII) flanquean el motivo VHIID, denominado así por sus residuos más destacados. El motivo LRI presenta una señal putativa de localización nuclear, NLS. Los motivos LR parecen ser importantes para las interacciones con proteínas o ADN (Yoshida *et al* 2014). En varias proteínas GRAS aparece una secuencia LXXLL, al principio del motivo LRI, que se corresponde con una secuencia consenso de mamíferos (Heery *et al.*, 1997). Dentro del dominio LRI varios residuos de leucina están en posiciones conservadas como el motivo Fx₂ALx₂R. Los aminoácidos que rodean el dominio VHIID también contienen algunos residuos conservados, como una prolina invariable y los motivos Fx₄ANx₂Ix₂A, GxGxG, QW y TG, los cuales posiblemente sean importantes para la función de GRAS. La secuencia VHIID está presente en todos los miembros de la familia, pero solo los residuos histidina y aspártico están altamente conservados. En el dominio LRII se encuentra otro motivo conservado, VNx₂FxLH. En la mayoría de los miembros de la familia de proteínas GRAS, hay varios motivos de aminoácidos adicionales invariables como el motivo PFYRE, designado así por los aminoácidos conservados. P, Y y F están conservados en la mayoría de las proteínas GRAS, incluidas las bacterianas. El motivo RVER define otro tramo de aminoácidos característico tanto en plantas como en bacterias. Los dominios PFYRE y RVER muestran más variación, lo que sugiere que quizá sean importantes para la especificidad de las interacciones con distintas proteínas. La parte C-terminal del dominio GRAS contiene varios triptófanos invariables y un motivo GF. La mayoría de las proteínas GRAS contienen en su parte más terminal el dominio SAW que posee un tercer residuo de triptófano conservado. Estos motivos en el dominio GRAS, que siempre se localizan en el mismo orden, les sirven para formar complejos con otras proteínas, elevando el nivel de complejidad de sus rutas de actuación (Welch *et al.*, 2007).

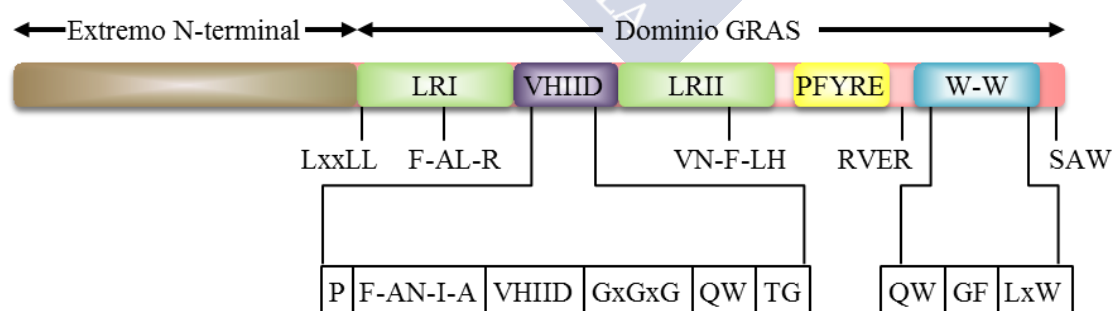


Figura 38.- Representación esquemática de los diferentes dominios de las proteínas GRAS. Se indican los motivos altamente conservados.

Aunque las proteínas GRAS han sido estudiadas durante las últimas dos décadas, su mecanismo molecular aún no está claro. Recientemente se publicó la estructura del dominio GRAS de

OsSCL7 de arroz proporcionando una visión de los potenciales mecanismos funcionales y ayudando a descifrar su modo de acción en procesos fisiológicos (Li *et al.*, 2016). La única estructura de las proteínas GRAS determinada hasta ese momento era el dominio N-terminal GAI de DELLA en complejo con GID1A unido a GA3 (Murase *et al.*, 2008). La estructura general del dominio GRAS consta de un subdominio núcleo coronado por un subdominio tapa y ayuda a una mejor comprensión de las características de los motivos GRAS conservados LRI, VHID, LRIL, PFYRE, y SAW (Li *et al.*, 2016). El núcleo del dominio GRAS se asemeja a un plegamiento Rossmann, lo que apoya la idea de que las proteínas GRAS podrían ser consideradas dentro de la superfamilia de metiltransferasas con plegamiento de Rossmann, a pesar de carecer de residuos para la actividad metiltransferasa (Zhang *et al.*, 2012). La estructura del dominio GRAS es un dímero, con una ranura clara para acomodar ADN de doble cadena. El acoplamiento de un segmento de ADN en el surco para generar un complejo de Os-SCL7/ADN proporcionó información sobre el mecanismo de unión al ADN de las proteínas GRAS. Además, se evaluó la propiedad de unión a ADN de Os-SCL7 *in vitro* y los residuos de reconocimiento definidos por el modelo (Li *et al.*, 2016).

Las proteínas GRAS tienen funciones en muchos procesos de crecimiento y desarrollo de plantas como iniciación y desarrollo de meristemas axilares (Schumacher *et al.*, 1999; Greb *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003), mantenimiento del meristemo del brote (Stuurman *et al.*, 2002), organización del patrón radial de la raíz y el brote (Pysh *et al.*, 1999; Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001), gametogénesis masculina (Morohashi *et al.*, 2003), transiciones de fase y determinación del meristemo floral (Curaba *et al.*, 2013), así como en la regulación de la nodulación (Kaló *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Heckmann *et al.*, 2006; Hirsch and Oldroyd, 2009; Oldroyd, 2013). Además, las proteínas GRAS desempeñan papeles en numerosas vías de señalización como transducción de la señal de giberelinas (Peng *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2001; Murase *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2014), transducción de señal en el fitocromo A (Bolte *et al.*, 2000; Torres-Galea *et al.*, 2013), señalización inducida por auxina y estrés (Morohashi *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2007). Los genes *GRAS* también han sido implicados en defensa y respuesta a estreses abióticos (Mayrose *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2010; Cui, 2012; Fode *et al.*, 2008), y se identificaron como dianas de miARNs durante el desarrollo de fruto del tomate y maduración (Moxon *et al.*, 2008; Karlova *et al.*, 2013).

6.1.2 SCARECROW y genes relacionados

Los genes *SHR* y *SCR* fueron inicialmente identificados en una búsqueda de mutantes con defectos en el patrón de raíces de *Arabidopsis* (Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995). Los mutantes *scr* y *shr* no solo tenían raíces más cortas, sino que también carecían de una capa de tejido fundamental (Benfey *et al.*, 1993; Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995; Di Laurenzio

et al., 1996; Helariutta *et al.*, 2000). El mutante *scr* tiene una capa celular con atributos tanto de córtex como de endodermis, mientras que el mutante *shr* carece de endodermis totalmente, lo que indica que la proteína SCR es necesaria para las divisiones asimétricas periclinales de las células para separar córtex y endodermis y SHR es esencial para la formación y especificación de la endodermis (Di Laurenzio, 1996; Benfey *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1995; Heidstra *et al.*, 2004; Helariutta *et al.*, 2000).

SCR se expresa en las mismas células donde se puede observar su función: CQ, endodermis, córtex, célula inicial de córtex/endodermis (ICE), y células derivadas (HICE), funcionando de manera autónoma de la célula (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Heidstra *et al.*, 2004). El gen *SHR* se expresa en la estela (periciclo y tejidos vasculares) y la proteína SHR se mueve a la endodermis, ICE, HICE y QC (Helariutta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2004; Sena *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007). SHR y SCR forman un complejo que activa la transcripción de SCR en la endodermis (Cui *et al.*, 2007; Cruz-Ramirez *et al.*, 2012). Además, la interacción proteína-proteína secuestra y limita el movimiento de la proteína SHR (Gallagher *et al.*, 2004; Sena *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2015).

En la raíz de *Arabidopsis* la regulación génica mediada por *SHR-SCR* es una vía de desarrollo bien caracterizada (Levesque *et al.*, 2006, Cui *et al.*, 2007, Sozzani *et al.*, 2010, Cruz-Ramirez *et al.*, 2012, Long *et al.*, 2015, Moreno-Risueno *et al.*, 2015). El gen *SCR* participa junto con el gen *SHR* en la división asimétrica de las células del MAR que origina el tejido fundamental (córtex y endodermis), estableciendo el patrón radial de la misma. El complejo SCR-SHR se inactiva después de la división asimétrica de la célula inicial de córtex/endodermis (ICE), y su función se explica por su habilidad de inducir cambios en los patrones de expresión génicos. SCR y SHR interactúan con la ciclina CYCD6-1 (Sozzani *et al.*, 2010), que se expresa en la ICE y parece actuar de manera redundante con reguladores del ciclo celular como CDKB2-1 y CDKB2-2 para inducir las divisiones celulares asimétricas en la ICE (Sozzani *et al.*, 2010). Pueden formar también complejos con los factores de transcripción JKD y MPG que actúan delimitando el campo de acción del tándem SCR/SHR (Welch *et al.*, 2007; Iyer-Pascuzzi y Benfey, 2009). JKD y MGP están implicadas en el establecimiento de los límites de córtex y endodermis (Cui *et al.*, 2007; Ogasawara *et al.*, 2011; Helariutta *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2006). En las raíces SHR interactúa con los factores de transcripción BIRD y junto con SCR juega papeles esenciales el patrón radial de la raíz (Welch *et al.*, 2007; Moreno-Risueno *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2015). Un reciente estudio demostró que *SCL23* también interactúa con SHR y SCR para especificar el destino celular de la endodermis en la raíz y la transcripción de *SCL23* está sujeta a regulación directa por SHR (Long *et al.*, 2015). SCR activa la expresión de MYB36 que a su vez regula la expresión de las proteínas CASP que son críticas para la

formación de las tiras de Caspari (característica de la etapa final de la diferenciación de la endodermis), estableciendo así un nexo entre CM y tejidos completamente diferenciados (Benfey, 2016).

En *Arabidopsis* se demostró que SHR y SCR se requieren para la formación del MC, aunque SCR también controla el número de divisiones celulares dependiendo de sus interacciones (Paquette y Benfey, 2005). SCR activa la división celular interactuando con SHR y la reprime formando complejo con el represor LHP1, y su función viene determinada por el ratio entre las concentraciones de los complejos SCR/LHP1 y SHR/SCR. Ya que la transcripción de SCR está bajo control de un bucle de retroalimentación, que depende del complejo SHR/SCR y se reestablece en cada división de ICE, el ratio no será constante en todas las células endodérmicas, más bien forma un gradiente a lo largo de la raíz, menor en el ápice y mayor en células más diferenciadas con acumulación de la proteína SCR. Como consecuencia de esto, SCR primero se comporta como activador de la división celular, pero por encima de un cierto umbral se comporta como represor (Cui y Benfey, 2009). SCL3 también está implicada en la formación de MC durante la maduración del tejido fundamental de la raíz (Heo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016). El complejo SHR/SCR regula SCL3 durante la maduración del tejido fundamental. Además, las proteínas DELLA (reguladores principales de la señalización de GA) regulan directamente a SCL3, por lo que SCL3 es un nexo molecular entre las vías hormonales (GA) y de desarrollo (SHR/SCR) que regulan el proceso de maduración en el desarrollo de la raíz (revisado por (Choi y Lim, 2016)). SEU está implicado en la formación de MC activando la expresión de SHR, SCR y SCL3 durante la maduración del tejido fundamental (Gong *et al.*, 2016). GAZ también juega un papel en el control de la formación de MC sirviendo como punto convergente de las vías ABA y GA durante la maduración del tejido fundamental (Lee *et al.*, 2016). En conjunto, múltiples entradas de las vías hormonales (ABA y GA) y de desarrollo (SHR, SCR, SCL3, SEU y GAZ) se integran para generar los dos tipos de células diferentes (endodermis y MC) durante la maduración del tejido fundamental (Choi y Lim, 2016).

Los genes *SHR* y *SCR* también son necesarios para otorgar la identidad del CQ y ayudar a mantener la actividad de las células troncales que lo rodean durante el patrón de desarrollo embrionario y post-embrionario (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003). Para llevar a cabo estas funciones el complejo SHR/SCR modula la expresión e interactúa con varias proteínas que varían entre los distintos tipos celulares (Welch *et al.*, 2007). SCR mantiene las células iniciales del MAR regulando la vía retinoblastoma, que es un punto de entrada clave en la fase G1 del ciclo celular. El gen Retinoblastoma-related (RBR) controla el nivel de CM en relación a células diferenciadas para mantener un MAR (Wildwater *et al.*, 2005). PLETHORA1 (PLT1) y PLETHORA2 (PLT2),

actúan en paralelo a SCR y SHR y se requieren para mantener las CM de la raíz, afectando a la identidad de CM de una manera dosis-dependiente, con los niveles más elevados especificando el nicho de CM de la raíz (Aida *et al.*, 2004). El gen *Schizoriza* (*SCZ*) se expresa en el CQ y tiene como papel facilitar la separación del destino celular entre el CQ y las CM de la columela. *SCZ* es requerido para la expresión de SCR y SHR en el CQ y promueve su transcripción (ten Hove *et al.*, 2010). Recientemente se comprobó que SCR controla el tamaño del MAR desde la endodermis regulando la proteína DELLA RGA que a su vez media la regulación de los niveles *ARR1* en la zona de transición (Moubayidin *et al.*, 2016).

Además, SCR y SHR participan en diversos procesos en los órganos aéreos de *A. thaliana* (Di Laurenzio, 1996; Wysocka Diller *et al.*, 2000; Heidstra *et al.*, 2004). El ARNm de SHR se encuentra en la vasculatura de las hojas, hipocótilos y tallos de inflorescencias (Gardiner *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2014), mientras que la proteínas SHR se detectan tanto en la vasculatura como en tejidos adyacentes (Gardiner *et al.*, 2011), lo que sugiere que SHR también actúa de manera similar a lo observado en la raíz. El ARNm y la proteína de SCR se encuentran en los tejidos equivalentes a la endodermis en hojas e hipocótilos y tallos de inflorescencias (bundle sheath y starch sheath) (Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2014). SHR y SCR junto con SCL23 juegan papeles en el desarrollo de la endodermis en las hojas (Cui *et al.*, 2014) y en los brotes (Yoon *et al.*, 2016). SHR activa la transcripción de SCR y SCL23 en la endodermis (y en sus equivalentes en hojas y brotes). Tanto SCR como SCL23 forman complejos proteicos con SHR para promover la expresión de SCR y SCL23 y confinar el movimiento de SHR a la endodermis. Por otra parte, la activación de SCR y SCL23 está bajo autorregulación. Las dos proteínas son capaces de formar complejos proteicos que pueden promover la expresión de SCL23 (Long *et al.*, 2015). Existe un mecanismo conservado de interacciones moleculares entre SHR, SCR y SCL23 en el desarrollo de endodermis funcional en raíces y brotes. También se observó que hay divergencia en las interacciones en el módulo SHR-SCR-SCL23 en el que la abundancia del ARNm de SHR y su proteína se modula por la diana directa de SCL23, lo que resulta en una regulación negativa (Yoon *et al.*, 2016).

SCR y *SHR* también afectan al desarrollo del xilema (Carlsbecker *et al.*, 2010; Levesque *et al.*, 2006) pudiendo regular indirectamente la formación del tejido vascular por medio de regulación de la expresión génica (Bolle, 2016).

La formación del patrón radial de la raíz y del brote es un evento temprano tanto en maíz como en *Arabidopsis* (Lim *et al.*, 2000). El patrón radial se regula durante el desarrollo embrionario por SCR (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Wysocka-Diller *et al.*, 2000). El gen *SCR* participa también en la división asimétrica que tiene lugar en la hipófisis en el estadio globular de los embriones en desarrollo (Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Laux *et al.*, 2004). Los miembros de la

familia GRAS probablemente juegan papeles cruciales en el desarrollo embrionario (Schlögl *et al.*, 2012).

Además de ser cruciales para el establecimiento del patrón radial y la renovación de las CM en la raíz de *A. thaliana*, SCR y SHR controlan no solo genes implicados en el desarrollo sino también en respuesta a estrés. SCR es esencial para la modulación de la homeostasis y respuesta a azúcares. SCR y SHR promueven el crecimiento de la raíz suprimiendo los efectos deletéreos del estrés. Varios factores transcripcionales tienen respuesta dual en respuesta a estrés y desarrollo. La regulación de las respuestas de desarrollo y estrés por reguladores transcripcionales únicos es un mecanismo general y eficiente de respuesta adaptativa en plantas (Cui, 2012).

Se han descrito genes ortólogos a *AtSCR* en *Z. mays* (*ZmSCR*), *O. sativa* (*OsSCR*) *P. sativum* (*PsSCR*) y *Lupinus albus* L. (*LaSCR1* y *LaSCR*) (Lim *et al.*, 2000, 2005; Sassa *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2003; Sbabou *et al.*, 2010). En especies forestales, se aislaron homólogos de *AtSCR* en *P. sylvestris* (Laajanen *et al.*, 2007), *P. glauca* (Moench) Voss (Stasolla *et al.*, 2003), *P. taeda* (Cairney *et al.*, 2006) y *P. tremula x tremuloides* (Schrader *et al.*, 2004). En *P. radiata* se han aislado y caracterizado varios genes de la familia GRAS entre ellos el gen *PrSCL1* con cierta homología a *AtSCR* (Sánchez *et al.*, 2007), el gen *PrSHR* homólogo de *AtSHR* (Solé *et al.*, 2008), y el gen *PrSCR* homólogo de *AtSCR* (Abarca *et al.*, 2014).

El gen *CsSCL1* (*C. sativa* *SCARECROW-LIKE-1*), caracterizado en nuestro laboratorio, se induce en respuesta a la aplicación exógena de auxinas en brotes de castaño competentes para enraizar (RB) durante las primeras 24 horas del proceso de inducción de raíces, cuando tiene lugar la desdiferenciación celular y la adquisición de un nuevo destino celular radicular, pero antes de que comience la división celular. Estos resultados sugieren que juega un papel durante los estadios primarios de la formación de RA (Sánchez *et al.*, 2007). La proteína codificada por el gen *CsSCL1*, contiene los motivos característicos de las proteínas SCARECROW-LIKE (SCL), pertenecientes a la familia GRAS. La homología de nuestro gen con diversos genes de esta familia de proteínas, abre la posibilidad de que también tenga similitudes en lo que respecta a la actividad del gen y sus funciones (Sánchez *et al.*, 2007).

Considerando la diferente respuesta morfogénica de los brotes C y RB al tratamiento con auxina, así como el supuesto papel de *CsSCL1* durante la formación de RA, cabe esperar que se detecten diferentes niveles de expresión o de localización del transcrito en ambos tipos de brotes bajo el tratamiento de inducción. Del mismo modo, y teniendo en cuenta que la inducción de embriones somáticos implica un proceso de desdiferenciación celular y adquisición de competencia, un análisis de la localización de la expresión del gen permitirá inferir su posible

participación en dicha etapa. Por otra parte, considerando que como hemos señalado anteriormente los genes GRAS ejercen un papel relevante en diversos procesos y formación de tejidos, también se analizará su expresión durante el desarrollo de embriones zigóticos y somáticos.

6.2 Resultados

6.2.1 Modelado de la estructura del dominio gras de *CsSCL1*

Con motivo de la reciente resolución de la estructura de un dominio GRAS (Li *et al.*, 2016), hemos modelado la estructura tridimensional de la proteína CsSCL1. Como se observa en la Figura 39, la comparación de los motivos característicos del dominio GRAS de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *CsSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007) con proteínas GRAS previamente descritas incluyendo OsSCL7 (Li *et al.*, 2016), muestra que está muy conservado en todas ellas (Figura 39).

		LRI	
CsSCL1	1	----VDRSLILCAQAVSTGDGRTEANELLKQIRQHSTPFG-DGSQRLAHFFANGLEARLAGTSVGTQM	64
PrSCL1	1	----VDRSLILCAQSVAAADTRGANETLKQIRQHSAAYG-DGSQRLANYFADGIAARISGS--GGRL	62
LlSCL	1	----VDRTLLIHCAQTVAIDRRSANDLLKQIRQHASPFG-DGMQRLAHYFADGLEARLAGM--GSEK	62
AtSCR	1	----LHLLTLLQCAEAVSADNLEEANKLLLEISQLSTPYG-TSAQRVAAYFSEAMSAARLLNSCL---	61
PsSCR	1	----LHLLTLLQCAEAVSAENLEQANKMLLEISQLSTPFG-TSAQRVAAYFSEAIARLVSSCLG---	61
ZmSCR	1	----LHLLTLLQCAEAVNADNLDDAHQTLLEIAELATPFG-TSTQRVAAYFAEAMSAARLVSSCLG---	61
OsSCL7	1	---CSAPILQSLLSCSRRAAT-DPGLAAELASVRAATDAG-DPSERLAFYFADALSRRLACGTGAPPS	65
PeSCL7	1	---SSPVLKAFVECAQLVES-KVDQAVKSLIKLKESVSENG-DPGERVGFYFVQGLCRRVAVG--ELDD	62
OsNSP2	1	-----	1
OsDLT	1	-----LVRAITACADSLSAGNHEAANYLLARLGEMASPACTPMHRVAAYFTEALALRVVRMWP----	59
OsGAI	1	---QEAGIRVHALLACAEAVQQENFAAAEALVKQIPTLAASQG-GAMRKVAAYFGEALARRVYRFRPA---	65
AtPAT1	1	---LRADLVSCAKAMSENDLMMHSMMEKLQMVSVSG-EPIQRLGAYLLEGLVAQLASS--GSSI	60
OsNSP1	1	SDRDMRWAEQLINPCAVAVEAGNLSRVQHLFYVLGELEBSFSG-DANRRLAAHGLRALARWLPAVGPAAA	69
AtLAS	1	-----LRRLLFTAAEFVSQSNFTAAQNLISLSLNSPFG-DSTERLVHLFTKALSVRINRQQDDQTA	62
AtSCL14	1	---ETADRTLLVLCAQAVSVDDRRTANEMLRQITREHSSPLG-NGSERLAHYFANSLEARLAGT--GTQI	64
AtSCL3	1	-----LIHLLTCAHNVASGSLQNAALQLSHLASPDG-DTMQRVAAYFTEALANRLKSWPG---	59
		VHIID	
CsSCL1	65	FYTSN-----RALTLEKLKAYQVHLSACFKRIAYSFSNKMIFHAAE	107
PrSCL1	63	FTMISSG-----ALSSAEILKAYQLLLVATPFKKISHEMTYQTVLNVAE	107
LlSCL	63	YHSFVAK-----PVS-ATDILKAYGLYSACPFKKVSFYFSTOMILDTE	106
AtSCR	61	-----IYAALPSRWMPQT---HSLKMVSFAQVFNGISPLVKFSHETANQAIQEAE	109
PsSCR	61	-----IYATLPVSSHPT---HNQKVSAFAQVFNGISPFVKFSHETANQAIQEAE	108
ZmSCR	61	-----LYAPLPGPSFAAR---LHGRVAAFAQVFNGISPFVKFSHETANQAIQEAE	110
OsSCL7	66	AEPDARF-----ASDELTLCYKTLNDACPYSKFAHETANQAILEATG	107
PeSCL7	63	LKNFHQT-----TSEFTLSYKALNDACPYSKFAHETANQAILEATG	104
OsNSP2	1	-----AGDVLTAFOMLQDMSPYMKFGHETANQAILEAVS	34
OsDLT	59	-----HMFDIGPPRELTDADFAGGGDDAMLRILNAITPIPRFLHETLNERILREFE	111
OsGAI	65	-----DSTLLDAAFADLLHAHFYESCPLYLKFAHETANQAILEAFA	105
AtPAT1	61	YKALNRC-----PEPASTELLSYMILYEVCPYKFGYMSANGAIAEAMK	105
OsNSP1	70	AAVRVPP-----CSERPTTAFAAEPRLFRASLIRFHEVSPWFALPNAIAAIAQAST	123
AtLAS	63	ETVATWTTNEMTMSNSTVFTSSVCKEQFLFRTKNNNSDFESCYYLWLNQLTPFIRFGHETANQAILDATE	132
AtSCL14	65	YALSS-----KKTSAADMLKAYQYMSVCPFKKAAIIFANHSMMRFTA	108
AtSCL3	59	-----LYKALNATQTRTNVSEEIHRRLFEFMFPLKVSYLLTNRAILEAM	107

			VHIIID			LRII	
CsSCL1	108	R---	ETT--LHIVDFGIQYGEOWPLLQFLSK----	REEGAPKLIRITGIDLQPGFRPAECLEETG---	164		
PrSCL1	108	G---	ETR--LHIVDFGILYGFOWPFLQCLAN----	RPGGPPMLRITGIEFPQPGFRPAERIEETG---	164		
LlSCL	107	K---	ASK--LHIVDFGIYFGFOWPFLQRLSK----	RPGGPPKLIRITGIDLQPGFRPAERIEQTG---	163		
AtSCR	110	K---	EDS--VHIIIDLIMOGLOWPGLFHILASR----	PGGPPHVRLTGLGTS-----MEALQATG---	160		
PsSCR	109	R---	EER--VHIIIDLIMOGLOWPGLFHILASR----	PGGPPYVRLTGLGTS-----METLEATG---	159		
ZmSCR	111	R---	EER--VHIIIDLIMOGLOWPGLFHILASR----	PGGPPRVRLTGLGAS-----MEALEATG---	161		
OsSCL7	108	A---	ATK--LHIVDFGIVOGIOWAALLQALALR----	PEGKPTRIRITGVPSLLGPOPAASLAATN----	165		
PeSCL7	105	K---	ASK--LHIVDFGIVOGIOWAALLQALALR----	SAGKEVRIIRISGIPAPVLGKNPAASLLATG---	162		
OsNSP2	35	G---	DRR--VHIVDYDTAEGHQAASLMQAMTSR----	ADGVPAHLRITAVSRSGGG--GARAVQEAG---	91		
OsDLT	112	G---	HER--VHVIDFDIKOGLOWPGLLQSLAAR----	AVPPAHVRITGVGES-----RQELQETG---	162		
OsGAI	106	G---	CHR--VHVVDGFIKOGMOWPALLOALALR----	PGGPPSFRITGVGPQPD--ETDALQOVG---	160		
AtPAT1	106	E---	ENR--VHIDFQIGOGSOWVTLTQAFAA----	RPGGPPRIRITGIDDMTSAYARGGGLSIVG---	162		
OsNSP1	124	CGAAGATPRP	LHVVDLGVSHGVQWPTLLESILTRQ--	PGGRAPPSVRLTVVGPATATSPVAFPSAPPGY	191		
AtLAS	133	T---	NDNGALHILDLISOGLOWPPLMQALAFSSNPSSPPSLRITGCGRD-----	VTGLNRTG---	189		
AtSCL14	109	N---	ANT--LHIDFGISYGEOWPALHRLSLS----	REGGSPKLIRITGIELPQRFPAEGVQETG---	166		
AtSCL3	108	G---	EKM--VHVIDLDASEPAQWLALLOAFNSR----	PEGPPHLRITGVVHHQ-----KEVLEQMA---	158		

			LRII			PFYRE	
CsSCL1	164	---	RRLEKYCNRFNVPFEYNATASQKWETIR-----	TEELKIERN	EVLAVNCAFRMKNLLDETVEGTS	224	
PrSCL1	164	---	RRLEDYAKSEFGVPFEYQATAT-KWENLD-----	VEELGLRSD	EVLVVNCLGRNLLDETVEGTS	223	
LlSCL	163	---	RRLEAYARSFNVPFEYQGIAT-KFETIK-----	IEDLRIAED	EMVVVNCFSFKNLADETVAEDC	222	
AtSCR	160	---	KRLSDFADKGLLPFEFCPLAE-KVGNLD-----	TERLNVKRK	EAVAVHWLQ--HSLYDVTGSDAH	217	
PsSCR	159	---	KRLSDFANKLGLPFEFFPAE-KVGNID-----	VEKLVNYSKS	EAVAVHWLQ--HSLYDVTGSDTN	216	
ZmSCR	161	---	KRLSDFADTLGLPFEFCVAE-KAGNVD-----	PEKLGVTRR	EAVAVHWLH--HSLYDVTGSDSN	218	
OsSCL7	165	---	TRLRDFAKLLGVDFEFVPLLR-PVHELN-----	KSDFLVEPD	EAVAVNFMQLYHLLGD--SDE	221	
PeSCL7	162	---	NRLDFAKLIDLNFEEFEPILT-PIQELN-----	ESCFRVEPD	EVLAVNFMQLYNNLGE--TPG	218	
OsNSP2	91	---	RRLSAFAASIGQPFSEFGQCRLDSDERFR-----	PATVRMVKG	EALVANCVLHQAAATTTIRRPTG	151	
OsDLT	162	---	ARLARVAAALGLAFEEHFAVDRLEVR-----	LWMLHVYKRG	ECVAVNCVLAMHRLIRDDAALT-	220	
OsGAI	160	---	WKLQAQFAHTIRVDFQYRGLVAATLADLEPFMLQPEGEADANEPE	VIAVNSVFELHRLLAQPGALEK	227		
AtPAT1	162	---	NRLAKLAKQFNVPFEFNSVS-VSVSEVK-----	PKNLGVRPG	EALAVNFAFVLHHPDESSTEN	221	
OsNSP1	192	DFSPHLLRYAKSINLDRISRAATLDDAVPG-----	DDG	EALVVCQFRGHAAAEER-----	244		
AtLAS	189	---	DLTRFADSLGLQCFHHTLVIVEEDLAGLLQIRLLALSAVQG--ETIAVNCVHLHKIFNDDGDMGT	255			
AtSCL14	166	---	HRLARYCQRHNVPEFYNATA-KKWETIQ-----	VEDLKLQGG	EYVVVNSLFRFRNLLDETIVLNS	225	
AtSCL3	158	---	HRLIEEAELDIPQCFNPVVS-RLDCLN-----	VEQLRVKTG	EALAVSSVLQLHTFLASDDDLMR	217	

			PFYRE				
CsSCL1	225	PR	-----	DAVNLIRRMK	237		
PrSCL1	224	PR	-----	NIVLNKIRSMN	236		
LlSCL	223	PR	-----	TRVLSMIRKIN	235		
AtSCR	217	---	-----	TLWLLQRLA	226		
PsSCR	216	---	-----	TLWLLQRLA	225		
ZmSCR	218	---	-----	TLWLLQRLA	227		
OsSCL7	222	LV	-----	RRVRLAKSLS	234		
PeSCL7	219	AV	-----	ETALKMAKSLN	231		
OsNSP2	152	SVAS	-----	FLSGMAALG	164		
OsDLT	220	---	-----	DFLGLARSTG	230		
OsGAI	227	---	-----	VLGTVHAVR	236		
AtPAT1	222	HR	-----	DRLLRMVKSLN	234		
OsNSP1	244	---	-----	REVLKARGIN	255		
AtLAS	255	---	-----	HFLSAIKSLN	265		
AtSCL14	226	PR	-----	DAVLKIRKIN	238		
AtSCL3	218	KNCALRFQNNPSGVDLQRVLLMSHGSAAEARENDMSNNNGYSPSGDSASSLPSPSSGRDTSFLNNAIWGLS	287				

			PFYRE				
CsSCL1	238	FDIFINSIVNGS	-----YNAPFFLTFRREALFHESALYDVFDVTI PRDNQOR	284			
PrSCL1	237	PRVFIQGVVNGA	-----YNASFFITFRREALFHYSALFDALETTVPRDNQOR	283			
LlSCL	236	PALFTLGVVNGS	-----YNAPFFVTRFRREALFHESALFDMLEMNTPRKDEOR	282			
AtSCR	227	PKVVTVEQDLS	-----HAG-SFLGRFVEATHYYSALFDSLGSYGESEER	272			
PsSCR	226	PKVVTVEQDLS	-----NAG-SFLGRFVEATHYYSALFDSLGSYGESEER	271			
ZmSCR	228	PKVVTMVEQDLS	-----HSG-SFLARFVEATHYYSALFDSLGSYGEDSPER	273			
OsSCL7	235	PAVVTLEGEYVS	-----LNRAGFVDRFANALSYRSLFESLDVAMTRDSPER	281			
PeSCL7	232	PRIVTLGEYVS	-----LNRVGYLTRFKNALRYTAVFESLDPNMSRDSQER	278			
OsNSP2	165	AKLVTVVEEAGEAEKDDDGDSAGDAAGGFVRQFMETLHRYSAVWDSLEAGFPTQSRVR	223				
OsDLT	231	ATILLCEHEGGG	-----LNSGRWEARFARALRYTAAAFDAVDAAGLPEASPA	278			
OsGAI	237	PRIVTVVEQEAN	-----HNSGSFLDRFETSLHYYSFMFDSLGGSSGQAEISPPAAGGGGGTD	294			
AtPAT1	235	PKVVTLVEQESN	-----TNTAAFFPRFEMETMNYAAMEFESIDVTLPRDHKOR	281			
OsNSP1	256	PELVVLSELD SGVG	-----VVGGDGGSAGGFHAARELLWRFLESTSAAFKGDVEE	307			
AtLAS	266	SRIVTMAERAN	-----HGDHSLNRFSEAWDHYMAIFDSL EATLPNRSRER	312			
AtSCL14	239	PNVFIPAILSGN	-----YNAPFFVTRFRREALFHYSALFDMCDSKLAREDEM	285			
AtSCL3	288	PKVMVTEQDSD	-----HNGSTLMERLLESITYAALFDCELETKVPTSQDR	334			

		PFYRE		SAW	
CsSCL1	285	VMF E REFYGREAMNVIANE-GL E VER P ET Y K Q S Q FRISRA E -FKQLPLNQEIMSLFRAKMKAW-YHKDF	351		
PrSCL1	284	FLIEKEIFGREILNVVACE-GSERLER P ET Y K Q W Q GR T Q R AG-FVQLPLDRSILSKSRDKVKTF-YHKDF	350		
LlSCL	283	LLIEQNIFGRDAMNVIACE-GTERVER P ET Y K Q W Q V R N F RAG-ETQLPLDRDIVKSKCKVKEL-YHKDF	349		
AtSCR	273	HVVEQQILSK E IRNVLA V G-GPS R SG E -VKFESWREKMQ Q CG-FKGISLAGNAAT Q ATLL L GMF-PSD G Y	338		
PsSCR	272	HVVEQQILSREIRNVLA V G-GPS R SG E -IKFHNWREKL Q QCG-ERGVSLAGNAAT Q ASTLL L GMF-PSE G Y	337		
ZmSCR	274	HVVEQQILSREIRNVLA V G-GPART G D-VKFGSWREKLA Q SG-TRAASLAGSAAA Q ASTLL L GMF-PSD G Y	339		
OsSCL7	282	VRVERWMEGER T QRA V GP E EGAD R TER M AGSSEW T LM E W C G-EPVPLSNYARS Q ADLLWN Y DSKY Y	350		
PeSCL7	279	LQVERLL L GR R IS G VL G PD--GIR R ER M ENKE Q WR V LM E SS G -EESVSLSHY A MS Q AKILLWN Y NYST L Y	345		
OsNSP2	224	GLVERVILAPNTAGAVSRA---YRGVD G EGRC G W G QW M R G SG-ETAVPLSCFN H S Q ARLL L GLF--ND G Y	287		
OsDLT	279	RAKAEEMFAREIRNA V AF E -G P ER F ER H ES F AGWRRR M ED G GG E KNAGIGEREAM Q GRMIAR M FGPD K -Y	346		
OsGAI	295	QVMSEV L GR Q ICNVVACE-GA E TER R ET L GW R N R L G RAG-EPV H IGSN V K Q ASTLL L ALFAGD G Y	362		
AtPAT1	282	INVEQHCLARDV V NI I ACE-GAD R VER H ELLG K W R S R FG M AG-FT P YPL S PLVN S TI K SL R N--YSD K Y	347		
OsNSP1	307	---RRILEAEAGAIL A AA---D V AA G EGRE G WR R ER M AA A AG-EEEA F GAE A VE S ARS L LR Y --DS G Y	367		
AtLAS	313	LTLEQRW F GKEILD V VAA E -ET E R K Q R HRR F E I W E EM K R F G-FVN V P T GS F ALS Q AKLL L RLH P SE G Y	380		
AtSCL14	286	LMYEKEFYGREIVNVVACE-GTERVER P ET Y K Q W Q AR L IRAG-ERQLPLEKEL M Q N L K L K IENG-YDK N F	352		
AtSCL3	335	IKVEKM L FG E EIK N IIS C E-GE R RRER H E K LE K W S Q R ID L AG-EGNVPLSY A ML Q ARR L L Q CG-GFD G Y	401		
		SAW			
CsSCL1	352	ILDE-DN-----HWML Q GW K GR I VYAS S C V EV-----	378		
PrSCL1	351	GVDE-DG-----NWML L GW K GR T IHA S TWR P ST-----	378		
LlSCL	350	VVDE-DG-----RWLL L GW K GR I IY A LSAW T EN S R-----	378		
AtSCR	339	TVVDDNG-----TL K LGW K DLS I LTASAW T PR S -----	366		
PsSCR	338	TVVEDNG-----IL K LGW K D L CLLTASAW R EP Y HTNT I IP H HN-----	375		
ZmSCR	340	TVVEENG-----AL K LGW K D L CLLTASAW R EQ V PP C R-----	372		
OsSCL7	351	SVVELPP-----AFL S LA W E K R P LLTVSA W R-----	376		
PeSCL7	346	SLDDSQP-----AFL L LA W NE V ELLTVSS W R-----	371		
OsNSP2	288	TVEETGP-----NK I VLGW K AR R LSAS V WA P PL P V S SP E G V C P V V G M AP V AT G GFAR T E F D Y ID	351		
OsDLT	347	TVQA H GGGGSGG E AL T IR W LD O PL Y TV T AW T PAGDGAGG S TV S AST A SH S Q Q S-----	401		
OsGAI	363	RVEEKEG-----CL T LGW H TR P LIAT S AW R VAA A -----	391		
AtPAT1	348	RLEE-RD-----GAL V LGW M HR D IVAS C AW K -----	372		
OsNSP1	368	EMSAPSP-----AAA A VAL R W K G O P V S F OS L WR E PA A -----	398		
AtLAS	381	N L Q F LN-----NS L ELGW Q N R EL F SV S W K -----	405		
AtSCL14	353	DVDQ-NG-----NWLL Q GW K GR I VYAS S LL W VE S S-----	381		
AtSCL3	402	RIKEESG-----CA V IC W Q D RE P LY S VSA W R C R K -----	429		

Figura 39.- Alineamiento de la región C-terminal de CsSCL1 con proteínas características de la familia GRAS de otras especies incluyendo la de OsSCL7 cristalizada recientemente (Li *et al.*, 2016). Los aminoácidos conservados se muestran en cajas negras y grises. Los aminoácidos que aparecen en cuadros negros representan las posiciones en las que todos los residuos son similares y los que aparecen en cajas negras representan las posiciones en las que al menos el 50% de los residuos son similares. Los dominios característicos de las proteínas GRAS se indican de acuerdo a lo observado en la estructura del dominio GRAS cristalizado. Los motivos conservados aparecen en cajas azules y la señal de localización nuclear en caja verde. Los residuos característicos de los dominios específicos se identifican con una letra roja. El alineamiento se realizó con Clustal X y posteriormente se dibujó con BioEdit.

La predicción de la estructura del dominio GRAS de CsSCL1 se realizó mediante modelado por homología usando como molde la estructura de OsSCL7 (5hyz.1). En la estructura (Figura 40) se observan los 5 dominios conservados en los que puede ser dividido el dominio GRAS (LRI, VHID, LRII, PFYRE y SAW). El dominio GRAS predicho (Figura 40A) contiene una lámina- β mixta de 8 hebras (B1-B9) con una pequeña hebra β B6 y 12 α -hélices (A1-A12) así como cinco 3_{10} hélices (η). El dominio GRAS está compuesto por los subdominios capa y núcleo. El subdominio capa, en la parte superior, está compuesto de un haz helicoidal formado por las α -hélices A1, A2 y A3 del motivo LRI y A9 y A10 del motivo PFYRE. El subdominio núcleo es mucho más grande formando una estructura similar a plegamiento Rossmann de tres capas intercaladas $\alpha/\beta/\alpha$. La lámina- β central está formada por las hebras β paralelas B1-B5 y ampliadas por las hebras β anti paralelas B9, B7 y B8. Flanqueando cada lado de la lámina- β central hay dos hebras helicoidales formadas por pequeñas 3_{10} hélices, α -hélices A8 y A11, y

A5, A6, A7, A12 respectivamente. El subdominio tapa está orientado más o menos de manera perpendicular al subdominio núcleo y ambos subdominios están unidos por un bucle largo y la hélice A4.

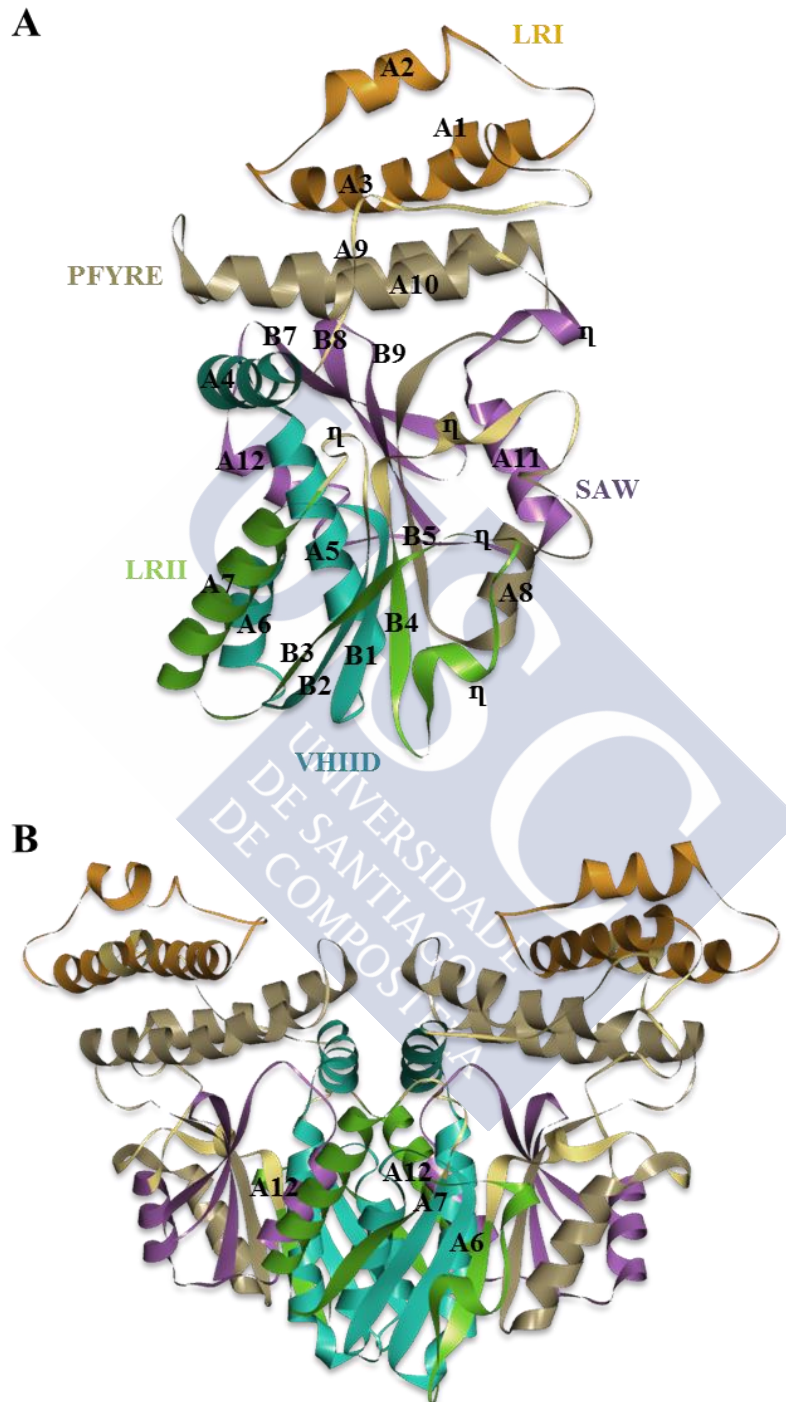


Figura 40.-Modelado de la estructura del dominio GRAS de la proteína CsSCL1 en forma de monómero (A) y de dímero (B). Se muestran los motivos característicos de las proteínas GRAS: LRI (naranja), VHIID (azul), LRII (verde), PFYRE (gris) y SAW (violeta).

El motivo LRI está compuesto por las hélices A1, A2, y A3 y la señal NLS está expuesta en la superficie de la proteína. El motivo VHIID está compuesto por B1, B2, A4, A5 y A6. El dominio LRII contiene la α -hélice A7, un tramo de dos hélices 3_{10} y hebras B3 y B4. Dentro de la estructura, el motivo PFYRE se compone de A8, B5, A9 y A10. El motivo SAW forma un dominio C-terminal bien plegado, compuesto por A11, A12, B7, B8 y B9 (Figura 40A). Esta estructura contiene las láminas- β y α -hélices en posiciones ortólogas a lo observado en la estructura cristalina de OsSCL7 (Li *et al.*, 2016).

Por otra parte, hemos modelado la proteína CsSCL1 en forma de dímero ya que OsSCL7 era un dímero en solución durante la preparación de la proteína (Li *et al.*, 2016). El dímero estaba formado principalmente por la interacción entre A12 con A7' y A6' a través de una interacción hidrofóbica hélice-hélice. Encima de la superficie del dímero estaba una gran hendidura formada por la hélice A4, el bucle entre la hélice A9 y A10 a los lados y el bucle entre A12 y B7 en el fondo. Se obtuvo el mismo patrón espacial y las mismas interacciones de las hélices que en OsSCL7 (Figura 40B).

6.2.2 Análisis de la expresión del gen *SCL1* durante la embriogénesis

Para determinar la posible implicación del gen *SCL1* en la embriogénesis hemos analizado su expresión durante el desarrollo de embriones zigóticos y somáticos de castaño, así como durante la inducción y desarrollo de embriones somáticos de roble.

6.2.2.1 Expresión del gen *CsSCL1* durante la EZ de castaño

En embriones zigóticos, se observa una mayor acumulación del transcrito en los embriones en estadios tempranos del desarrollo (Figura 41 A, B, D y E). En los embriones en estadio globular/oblongo hay una señal más intensa en las células que darán lugar al polo radicular, donde se observa una organización del patrón de división celular, así como en la zona del polo apical que presuntamente dará lugar a los cotiledones (Figura 41 A y B y detalles), y dicho patrón se mantiene en los embriones en estadio corazón (Figura 41 D y E). Durante la transición corazón-torpedo el patrón se modifica o polariza, con señal de hibridación muy localizada en células que posiblemente corresponden al futuro MR y en la zona de crecimiento de los cotiledones incipientes (Figura 41F). En los embriones torpedo, la señal es más evidente en el polo radicular y células precursoras de tejido fundamental (Figura 41 G y H), cuyo patrón se mantiene en embriones en estado más desarrollados (Figura 41 J, K, N y Ñ). La expresión también se localizó en la zona de crecimiento de los cotiledones (Figura 41 G, J, M y N) y en la capa más externa del MA (Figura 41 M, N y Ñ). Con respecto a los tejidos maternos, el transcrito se localizó con niveles moderados en el endotelio y en el endospermo del óvulo (Figura 41).

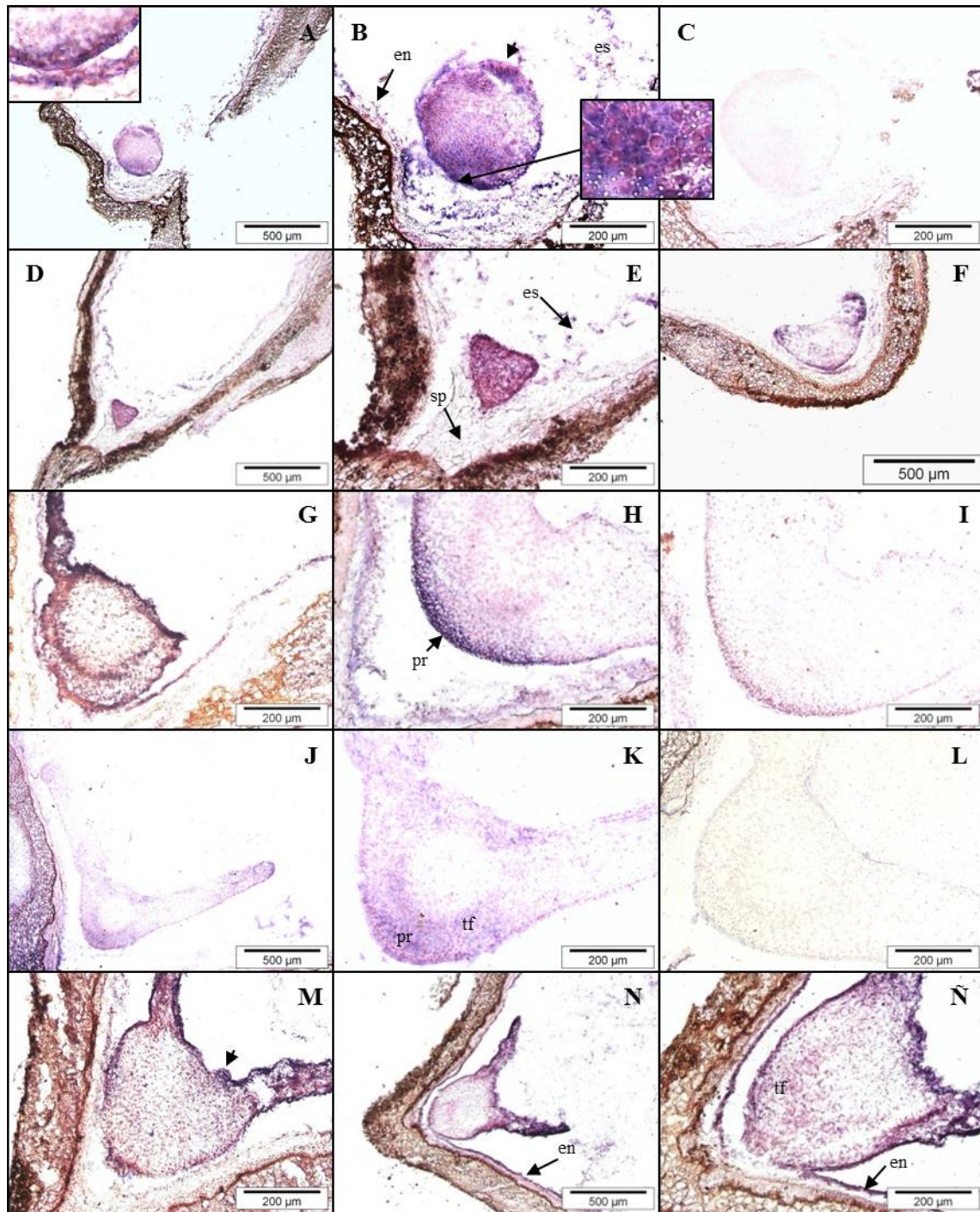


Figura 41.- Localización *in situ* del ARNm *SCL1* durante la EZ de castaño, utilizando las sondas específicas Anti *SCL1* (A, B, D, E, F, G, H, J, K, M, N y Ñ) y Sense *SCL1* (C, I y L). **A-C:** Embrión zigótico en estado globular; **D-F:** Embrión zigótico en estado corazón; **G-I:** Embrión zigótico en estado torpedo-cotiledonar; **J-L:** Embrión zigótico en estado cotiledonar temprano; **M-Ñ:** Embrión zigótico en estado cotiledonar. Nótese la ausencia de señal en los controles. en (endotelio); es (endospermo); pc (procambium); pr (polo radicular); sp (suspensor); tf (tejido fundamental).

Como se muestra en la Figura 42, en embriones en estado más avanzado, la señal de hibridación se localizó predominantemente en el polo radicular, tanto en los embriones en estado cotiledonar avanzado (Figura 42A y B) como en ejes embriogénicos aislados de la semilla

inmadura (Figura 42 D, G y H), mostrando también señal en la putativa capa L1 del MA (Figura 42 A, B, D y E). En el polo radicular de los ejes embrionarios (Figura 42 G y H), se observa una señal intensa en el MR, en las células precursoras de tejido fundamental y de la columela (Figura 42 D, G y H). Cabe señalar una intensa señal en las células iniciales del tejido fundamental y/o en las células derivadas de la HICE que darán lugar a la endodermis (Figura 42 H, flechas). La ausencia de señal en el procambium claramente apreciable en la Figura 42 G, apoya la interpretación de que la expresión está asociada al tejido fundamental y no al procambium.

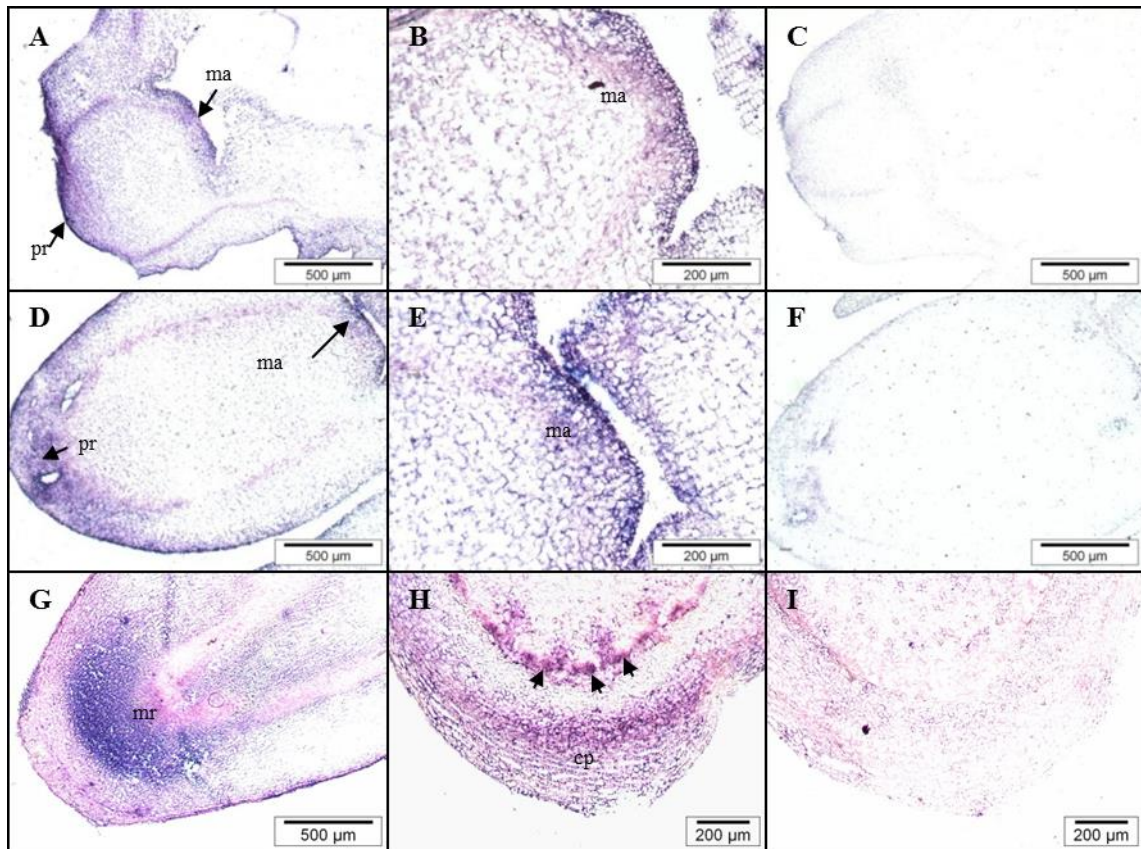


Figura 42.- Localización *in situ* del transcrito *SCL1* en secciones longitudinales de embriones zigóticos de castaño en estadio cotiledonar avanzado (A, B y C) y eje embrionario aislado de una semilla inmadura (D, E, F, G, H e I) hibridadas con la sonda específica de *SCL1* antisentido (A, B, D, E, G y H) y sentido (C, F e I). Nótese la ausencia de señal en los controles. cp (caliptra); ma (meristemo apical); mr (meristemo radicular); pd (protodermis); pr (polo radicular).

6.2.2.2 Expresión de *SCL1* durante la inducción de embriones somáticos.

Se analizó el patrón de expresión del gen *CsSCL1* durante la inducción de embriones somáticos de roble a partir de hojas de brotes *in vitro* procedentes de árboles adultos (Toribio *et al.*, 2004; Valladares *et al.*, 2006). De manera similar a los experimentos realizados en los análisis de expresión de *CPE* (Apartado 5.2.3.2), se utilizaron callos embriogénicos del genotipo Sainza a partir de los que se desarrollaron los embriones. Algunas de las secciones utilizadas eran

contiguas a las utilizadas en el análisis de *CPE*. Se detectó una señal muy abundante en las estructuras embriogénicas que surgían del callo (Figura 43 A y B), mientras que apenas se detectó expresión en las células parenquimáticas de la zona interior del callo (Figura 43 A, B y D). En proembriones o embriones globulares, se detectaron elevados niveles de expresión en todo el embrión (Figura 43B y D). En embriones cotiledonares, el transcrito se localizó en las células precursoras del tejido fundamental y en el MR (Figura 43 E). En un estado más avanzado de desarrollo la expresión está asociada principalmente al polo radicular (Figura 43 G, H, J y K), donde se expresa en el MR (Figura 43 G y J), más concretamente en el supuesto CQ y en las células más distales del meristemo (Figura 43 H y K). En estos embriones, también se detectó expresión del gen en la capa más externa de las yemas incipientes desarrolladas en el dominio apical del embrión (Figura 43 I y L).

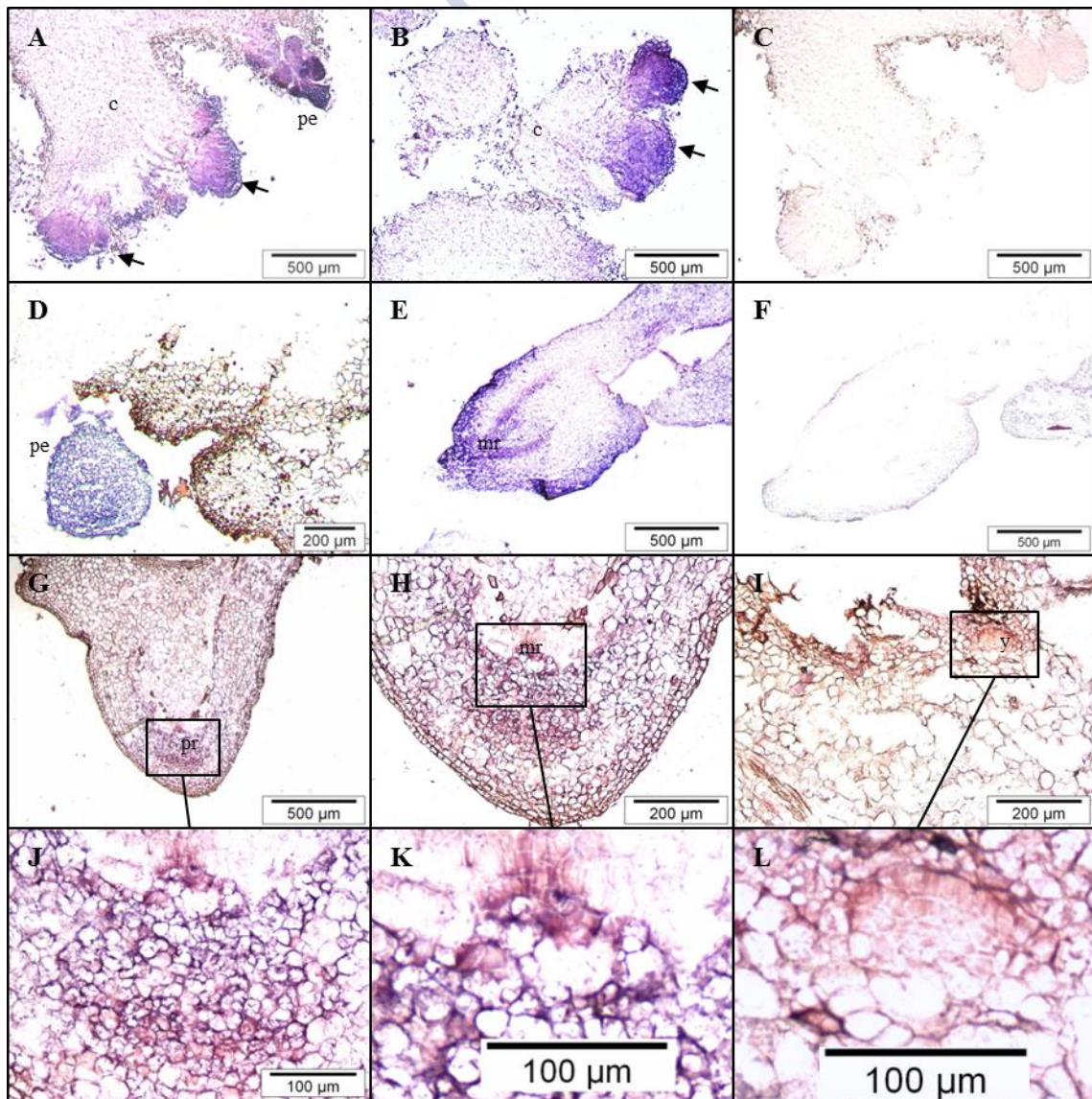


Figura 43.- Localización *in situ* del ARNm del gen *SCL1* durante el proceso de inducción y desarrollo de embriones somáticos de roble de la línea Sainza hibridados con la sonda específica antisentido (A, B, D, E, G, H, I, J, K y L) y sentido (C y F). En las imágenes A, B y C se muestran secciones de callo embriogénico formado en los explantos de

hoja mostrando agregados proembriogénicos (flechas) y proembriones emergiendo de las capas periféricas del callo, nótese la ausencia de señal en la sección control (C). Se muestran también secciones de un embrión oblongo unido al callo (D) y de embriones cotiledonares (E, F y G) desarrollados durante la inducción. Se muestran detalles del polo radicular (H) y parte apical (I) del embrión G así como imágenes con mayor aumento de las células iniciales de la caliptra (J), el MR (K) y una yema incipiente (L) del mismo. c (callo); mr (meristemo radicular); pe (proembrión); y (yema).

6.2.2.3 Expresión del gen *SCL1* durante la embriogénesis secundaria

Durante la proliferación de los embriones de roble y castaño mediante embriogénesis secundaria, se han aislado embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo (globular, torpedo y cotiledonar) a partir de diferentes líneas embriogénicas, para analizar la expresión del gen durante el desarrollo de los mismos.

6.2.2.3.1 Castaño

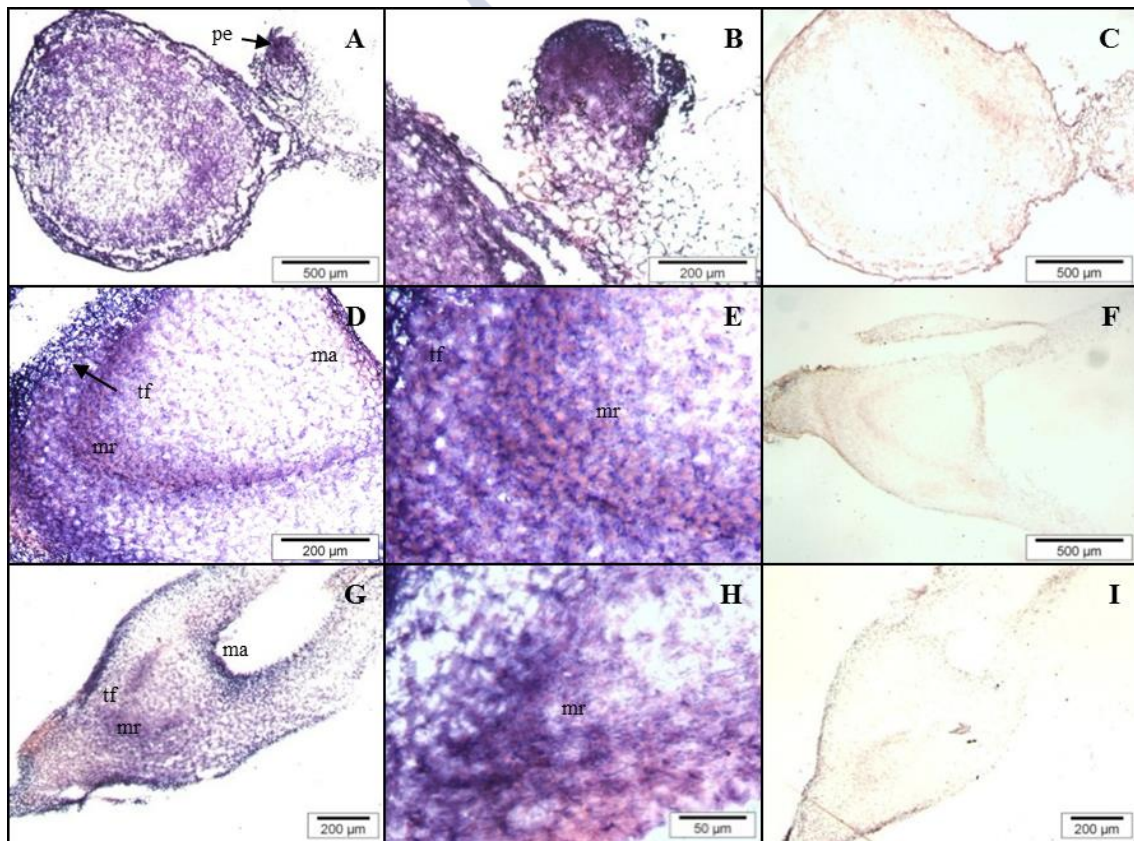


Figura 44.- Localización *in situ* del ARNm *SCL1* durante la ES de castaño de la línea HV, utilizando las sondas específicas antisentido *SCL1* (A, B, D, E, G y H) y sentido *SCL1* (C, F e I). **A-C**: Embrión somático en estado globular; **D-I**: Embriones somáticos en estado cotiledonar; ma (meristemo apical); mr (meristemo radicular); pe (proembrión); tf (tejido fundamental).

Tanto en embriones de la línea CI-3 como de la línea HV, el gen mostró una elevada expresión en estructuras proembriogénicas generadas durante la proliferación de los embriones mediante embriogénesis secundaria (Figura 44 A, B, Figura 45 A, B, D y E). En los embriones globulares

y corazón el gen se expresó abundantemente en todo el embrión, incluyendo la protodermis (Figura 44 A, B y Figura 45 G, H).

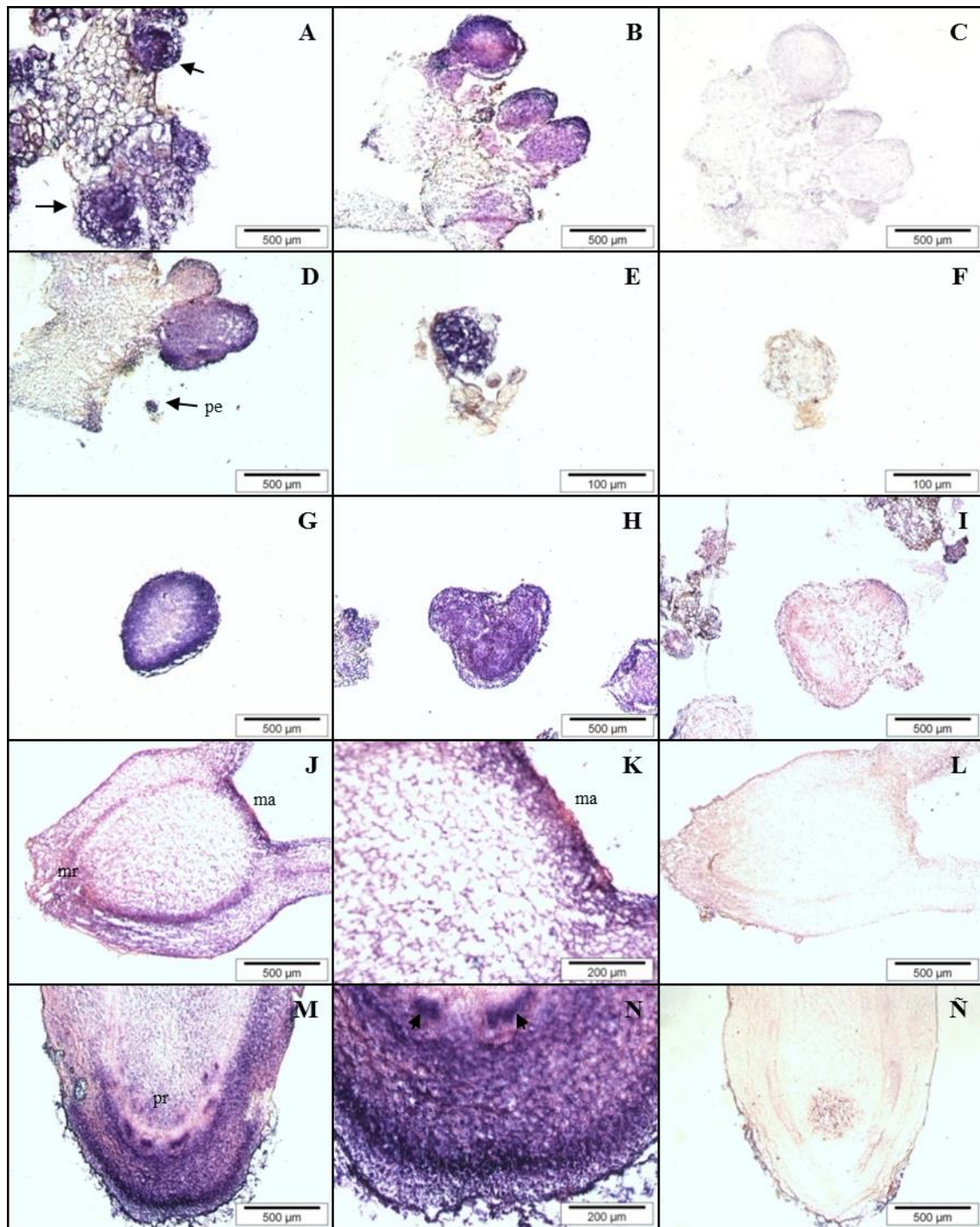


Figura 45.- Localización *in situ* del ARNm *SCL1* durante la ES de castaño de la línea CI-3, utilizando las sondas específicas antisentido (A, B, D, E, G, H, J, K, M y N), y sentido (F, I, L y Ñ). **A-D:** Estructuras embriogénicas (flechas) y embriones secundarios desarrollándose en la periferia de la masa embriogénica. Nótese la presencia de un proembrión aislado en D (pe); E y F: imagen ampliada del proembrión; G: embrión somático en estado globular; H-I: embrión somático en estado corazón; **J-L:** Embrión somático cotiledonar; **M-Ñ:** Embrión somático cotiledonar más avanzado. ma (meristemo apical); mr (meristemo radicular); pe (proembrión); pr (polo radicular).

A medida que avanza la histodiferenciación de los embriones, el transcrito se localizó en la capa más externa del MA (Figura 44 D y G; Figura 45 J y K), en el MR (Figura 44 D, E, G y H; Figura 45 J) y en el meristemo fundamental (Figura 44 D y G; Figura 45 J). En embriones en estadio cotiledonar más avanzado la señal es muy intensa en el polo radicular, con elevada expresión en las células iniciales de la columela y tejido fundamental y sus derivadas (Figura 45 M y N). El gen *CsSCL1* en el polo basal de estos embriones, mostró una expresión abundante asociada a las HICE y sus derivadas que darán lugar a la endodermis (Figura 45 N, flechas), mostrando un patrón de expresión similar a lo observado en los ejes embrionarios (Figura 42 H).

6.2.2.3.2 **Roble**

El análisis de la expresión del gen *SCL1* durante el desarrollo embriogénico de roble en dos líneas embriogénicas (Sainza y B17), mostró un patrón similar al que acabamos de describir en castaño. En embriones en estadio globular de las dos líneas analizadas, el gen se expresó abundantemente en todo el embrión incluyendo la protodermis (Figura 46 A, B y D; Figura 47 A). En general, la expresión en la protodermis se mantiene durante el desarrollo del embrión (Figura 46 G, J y M y Figura 47 C, G y J). La expresión se mantiene elevada en embriones en estado oblongo, mostrando una señal más intensa en las células que darán lugar a los polos del embrión (Figura 46 F). En general, a medida que el embrión avanza su desarrollo, la señal se atenúa y se localiza en los polos apical y basal del embrión, concretamente en la capa más externa del MA y en el polo radicular (Figura 46 G y H; Figura 47 C y D). En embriones torpedo, es frecuente la presencia de embriones globulares originados por embriogénesis secundaria (Figura 46 J y K) y de estructuras embriogénicas (Figura 46 N y Figura 47 F, flechas) desarrolladas a partir de la protodermis, que mostraron una elevada señal de hibridación. La polarización de la señal, sigue siendo notoria en los embriones cotiledonares, cuya expresión está predominantemente asociada al MA (Figura 46 M y N; Figura 47 G y J), polo radicular (Figura 46 M y N; Figura 47 G, H, J y K), donde parece localizarse en el meristemo, sobretodo en la zona de las primeras divisiones para establecer el patrón radial (Figura 47 I y K).

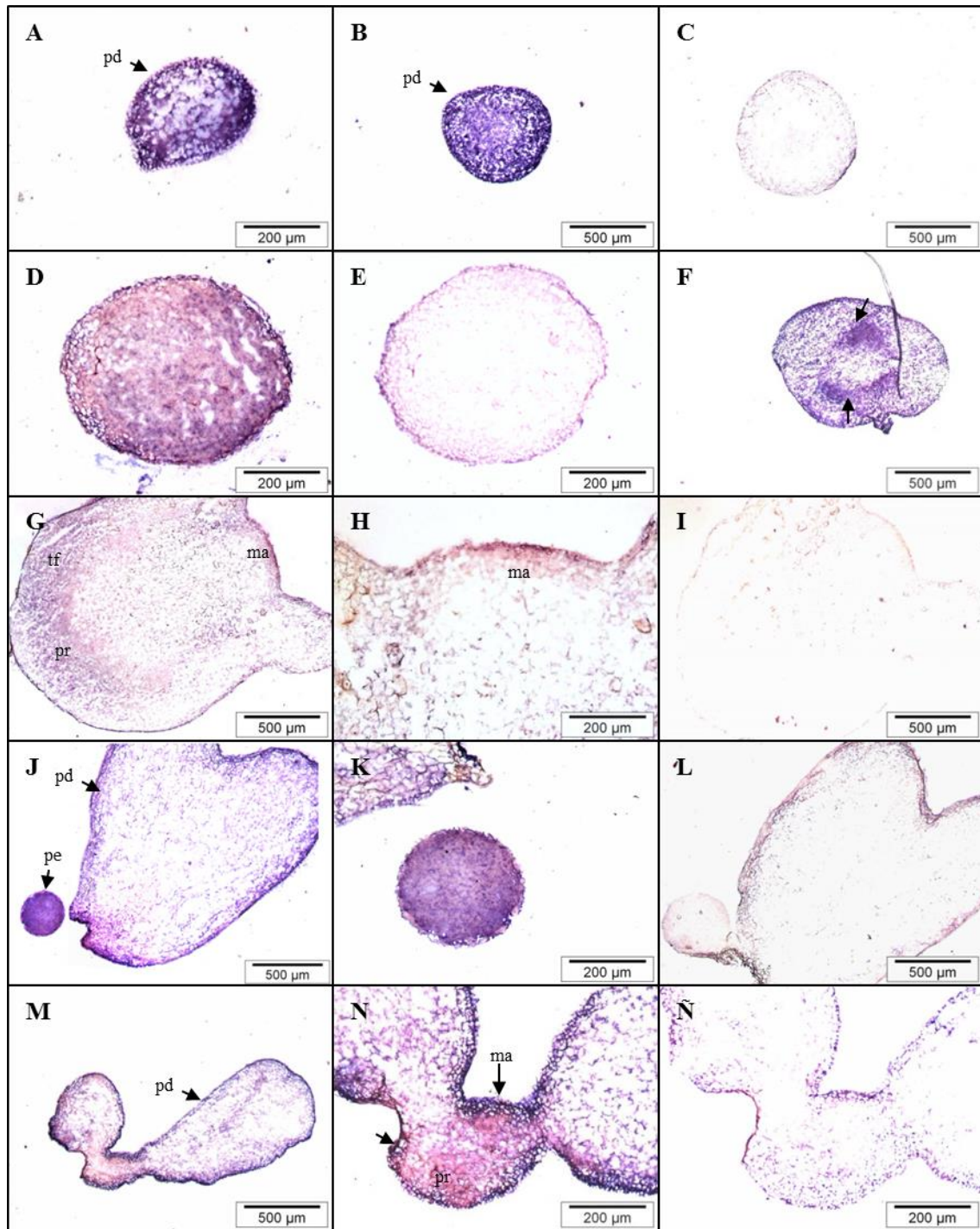


Figura 46.- Localización *in situ* del transcrito *SCL1* en secciones longitudinales de embriones somáticos de roble de la línea Sainza utilizando las sondas específicas antisentido (A, B, C, D, G, H, J, K, M y N) y sentido (C, E, I, L y Ñ) apreciándose en estas últimas la ausencia de señal. Se muestran embriones en estadio globular (A, B, C, D y E) y transición entre globular y oblongo (F) mostrando áreas meristemáticas polarizadas (flechas). Se pueden observar también embriones en estadio torpedo (G, H, I, J, K y L), y cotiledonar (M, N y Ñ). En las secciones J, K y L se aprecia un proembrión originado por embriogénesis secundaria en la zona del hipocótilo del embrión torpedo. ma (meristemo apical); pd (protodermis); pe (proembrión); pr (polo radicular); tf (tejido fundamental).

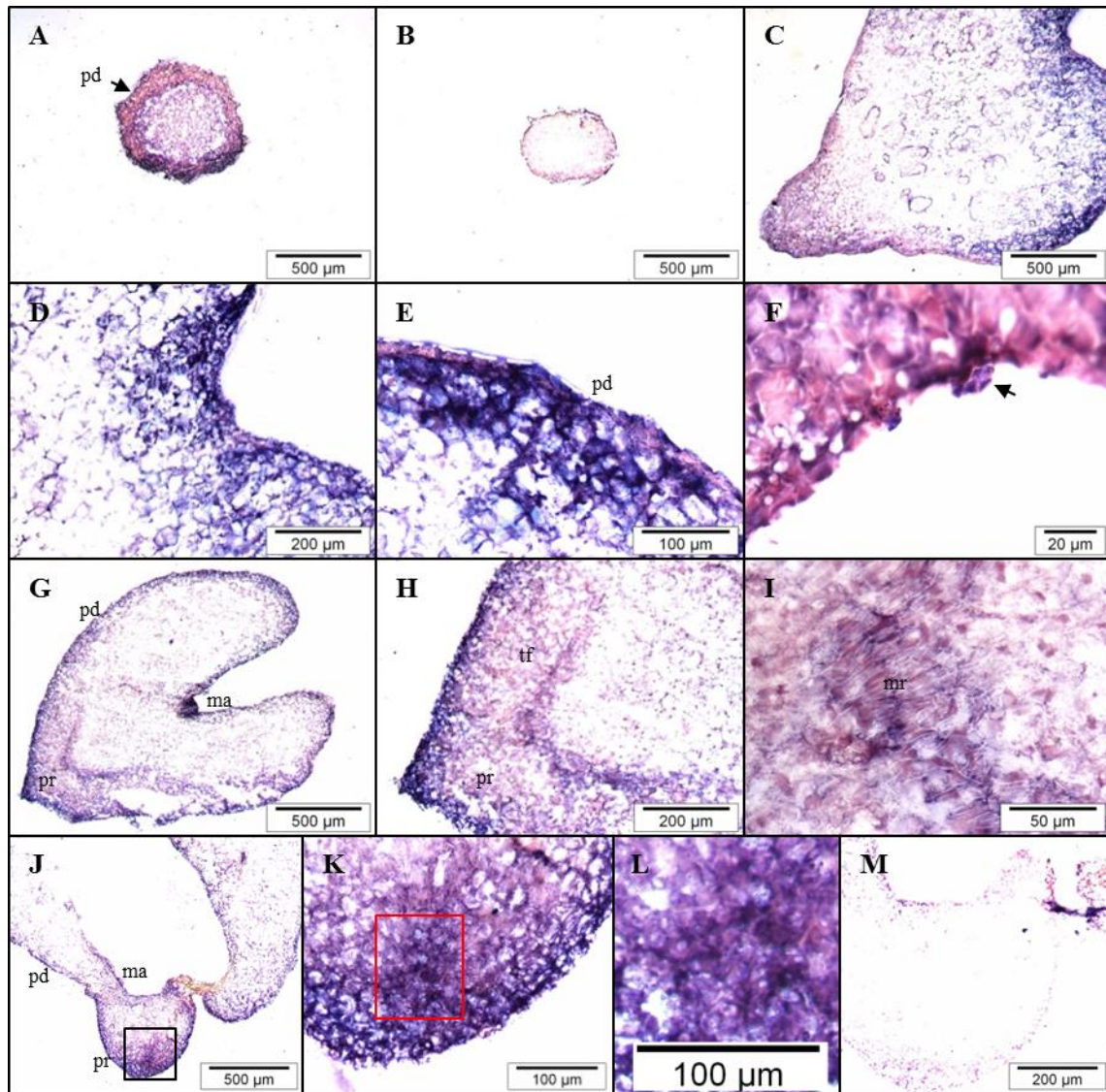


Figura 47.- Localización *in situ* del transcrito *SCL1* en secciones longitudinales de embriones somáticos de roble de la línea B17 hibridadas con la sondas específicas antisentido (A, C, D, E, F, G, H, I, J, K y L) y sentido (B y M). Se muestran embriones en estadio globular (A y B), torpedo (C) y cotiledonar (G y J). En las imágenes D, E y F se muestran detalles del embrión C, en las imágenes H e I del embrión G. También se muestran detalles del polo radicular (K) y meristemo (L) del embrión J. ma (meristemo apical); mr (meristemo radicular); pd (protodermis); pr (polo radicular); tf (tejido fundamental).

6.2.3 Análisis de la expresión del gen *CsSCL1* durante la formación de raíces adventicias

En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que el gen *CsSCL1* se induce por auxina en brotes de castaño durante el EA *in vitro*, pero con perfiles de expresión diferentes en brotes RB y C (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011). Para determinar si la expresión diferencial del gen en ambos tipos de brotes en respuesta a la auxina está relacionada con la adquisición del destino de células iniciales de raíz, llevamos a cabo experimentos de hibridación *in situ* con

secciones basales de brotes tratados y no tratados con auxina y transferidos a un medio libre de auxina durante diferentes periodos de tiempo.

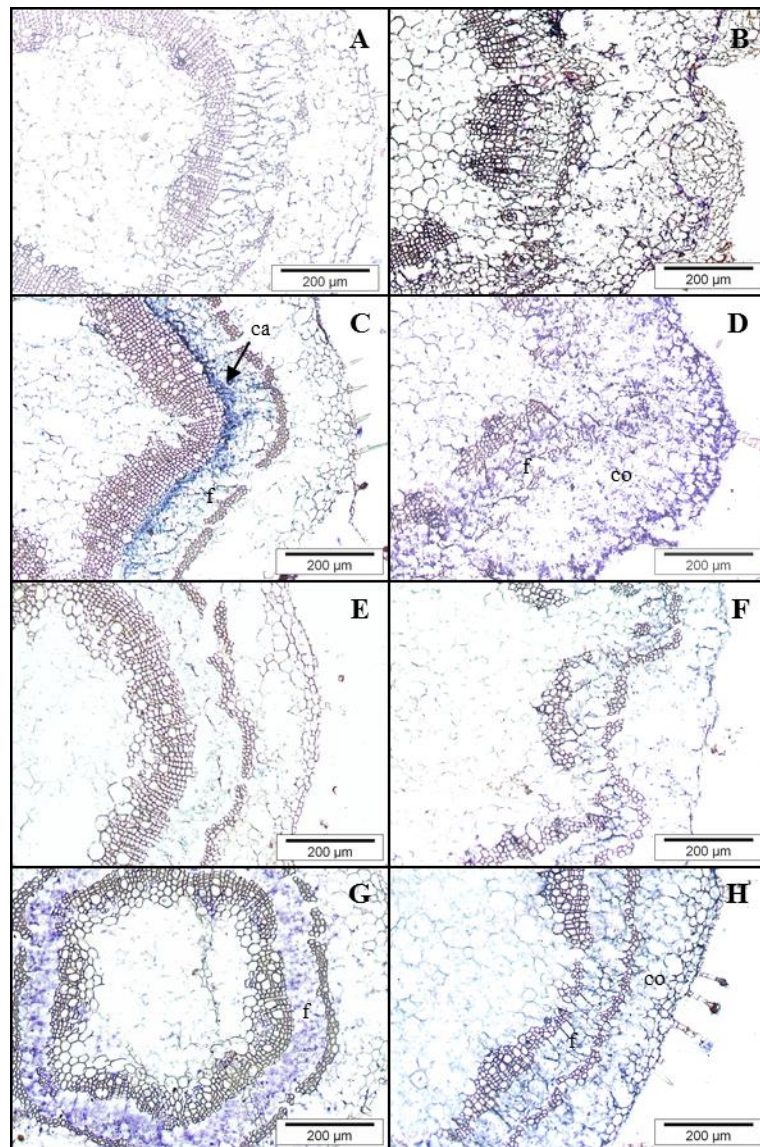


Figura 48.- Localización *in situ* del ARNm *SCL1* en secciones transversales de brotes con características juveniles (RB) y adultos (C), tratados con AIB y sus respectivos controles (no tratados con AIB), recogidos a distintos tiempos. Las muestras fueron hibridadas con la sonda específica antisentido *SCL1*. A: Sección de brote RB control recogido a las 12 horas; B: Sección de brote C control recogido a las 12 horas; C: Sección de brote RB tratado con IBA recogido a las 12 horas; D: Sección de brote C tratado con AIB recogido a las 12 horas; E: Sección de brote RB control recogido a las 24 horas; F: Sección de brote C control recogido a las 24 horas; G: Sección de brote RB tratado con AIB recogido a las 24 horas; H: Sección de brote C tratado con AIB recogido a las 24 horas. ca (cambium); co (córtez); f (floema).

El ARNm de *CsSCL1* no se detectó en las bases de los brotes recolectados al final del periodo de multiplicación (Tiempo 0; no mostrado) o en los brotes control recogidos después de 12 y 24 horas en el medio sin AIB (Figura 48 A, B, E y F). En brotes RB tratados con AIB, recolectados 12 horas después del tratamiento auxínico, se observó una acumulación preferencial del

transcrito de *CsSCL1* tanto en el cambium vascular como en células derivadas de él (Figura 48C), a partir de las cuales se inician las RA. En secciones recogidas 24 y 48 horas después de la aplicación del tratamiento, la expresión de *CsSCL1* localizó también en el floema (Figura 48G; Figura 49A y B), donde ciertas células mostraron una intensa señal de hibridación. Sin embargo, en secciones de brotes C recogidos 12, 24 y 48 horas después del tratamiento con auxina, se detectó una señal débil y difusa distribuida en el floema y parénquima cortical (Figura 48 D y H, Figura 49 C y D), sin localización específica en las células del cambium. El análisis realizado en yemas axilares que se desarrollan en la base del tallo de brotes tanto RB como C mostró una acumulación del transcrito en las células del meristemo apical de las yemas axilares y en los primordios foliares (Figura 49 A, B, C y D).

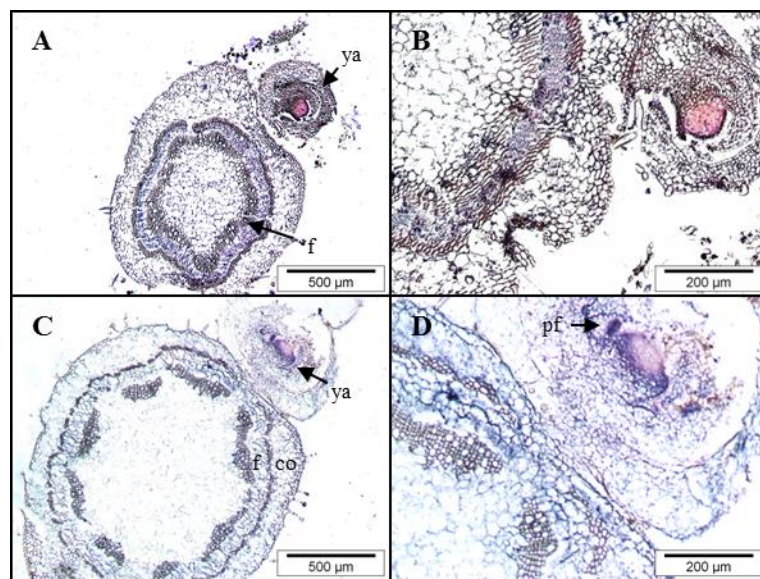


Figura 49.- Localización *in situ* del ARNm *CsSCL1* en secciones transversales de brotes juveniles o RB (A y B) y adultos o C (C y D), tratados con IBA y recogidos a las 48 horas hibridados con la sonda específica antisentido. En las imágenes B y D se muestran detalles de yemas axilares desarrolladas en los brotes A y C respectivamente. co (cortex); f (floema); pf (primordio foliar); ya (yema axilar).

Después de 7 y 9 días del tratamiento con AIB, en los brotes RB se pueden observar primordios radiculares perfectamente desarrollados (Figura 50A, C y D), con el ápice extendiéndose a través del córtex. En estos tejidos los transcritos de *CsSCL1* están restringidos al desarrollo del primordio de la raíz. En contraste, en los brotes C tratados con AIB, las divisiones celulares dieron lugar a una estructura indiferenciada en forma de callo (Figura 50E) sin observarse expresión del gen *CsSCL1*.

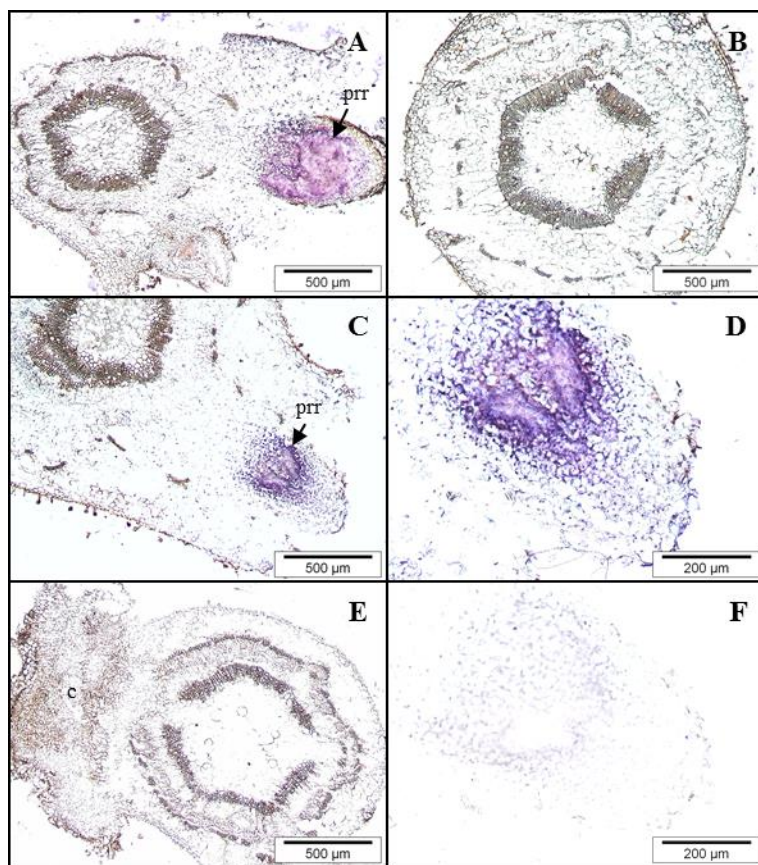


Figura 50.- Localización *in situ* del ARNm *SCL1* en secciones transversales de brotes con características juveniles (RB) y adultas (C) de castaño, con y sin tratamiento con AIB, recogidos a distintos tiempos e hibridados con la sonda antisentido (A, B, C, D y E) y con las sentido de *CsSCL1* (B). A: Sección de brote RB tratado con IBA recogido a los 7 días; B: Sección de brote RB no tratado con AIB recogido a los 7 días; C: Sección de brote RB tratado con AIB recogido a los 9 días; D: El primordio de la raíz de C a mayor aumento; E: Sección de brote C tratado con IBA recogido a los 9 días; F: Detalle de sección de brote RB tratado con IBA recogido a los 9 días. c (callo); pr (primordio de la raíz).

6.2.4 Análisis de la expresión del gen *CsSCL1* durante el desarrollo de la raíz

En la Figura 51 se muestra la localización de *CsSCL1* en secciones transversales de la zona apical de una raíz. En la zona donde se comienza a ver la diferenciación del tejido vascular, la expresión del gen se detectó en la endodermis y en las capas más internas del córtex (Figura 51 A). A medida que nos aproximamos hacia la zona del MAR, el transcrito se localiza en el córtex, las células de la endodermis asociadas al polo xilemático y en la protodermis (Figura 51C). En secciones más próximas al ápice de la raíz, la expresión se detectó en el meristemo fundamental (Figura 51 E y F), y en la zona más apical la expresión se localizó en el MAR, en las células iniciales y/o derivadas que van a establecer el patrón radial, así como en la columela (Figura 51 G y H).

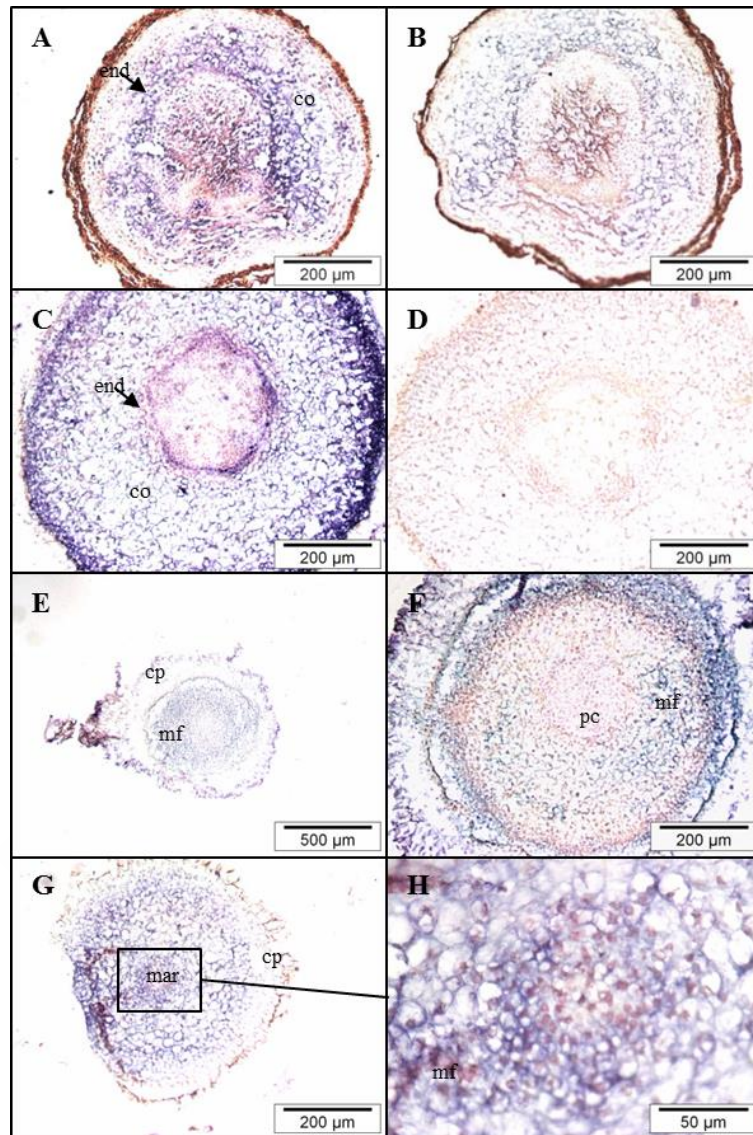


Figura 51.- Localización *in situ* del ARNm *CsSCL1* en secciones transversales de una raíz desarrollada a partir de un brote en multiplicación de castaño hibridadas con las sondas específicas *CsSCL1* antisentido (A, C, E, F, G y H) y sentido (B y D). Nótese la ausencia de señal en los controles. co (córtez); cp (caliptra); end (endodermis); mar (meristemo apical de la raíz); pc (procambium); tf (tejido fundamental).

En la Figura 52 se muestra la localización del gen en secciones longitudinales del ápice de la raíz. Como podemos observar, el gen se expresa en el tejido fundamental y el MAR (Figura 52). En el MAR, el transcrito se localizó en las células que rodean al putativo CQ, que se corresponden con las CM que darán lugar mediante divisiones asimétricas a los distintos tejidos de la raíz (Figura 52 A y B). En la Figura 52 D, la flecha indica el borde del meristemo donde el córtex se abre a la base de la columela. En Fagáceas, las células iniciales del córtex más interno yacen sobre la punta de los inicios de la estela y de la zona media a la externa forma un grupo de células que puentea los límites entre córtex y columela, donde se observa expresión (Figura 52 A, B, D y E). En las células de la zona de proliferación o división de la raíz el gen *CsSCL1* se expresa en el tejido fundamental (Figura 52 D, G, H e I).

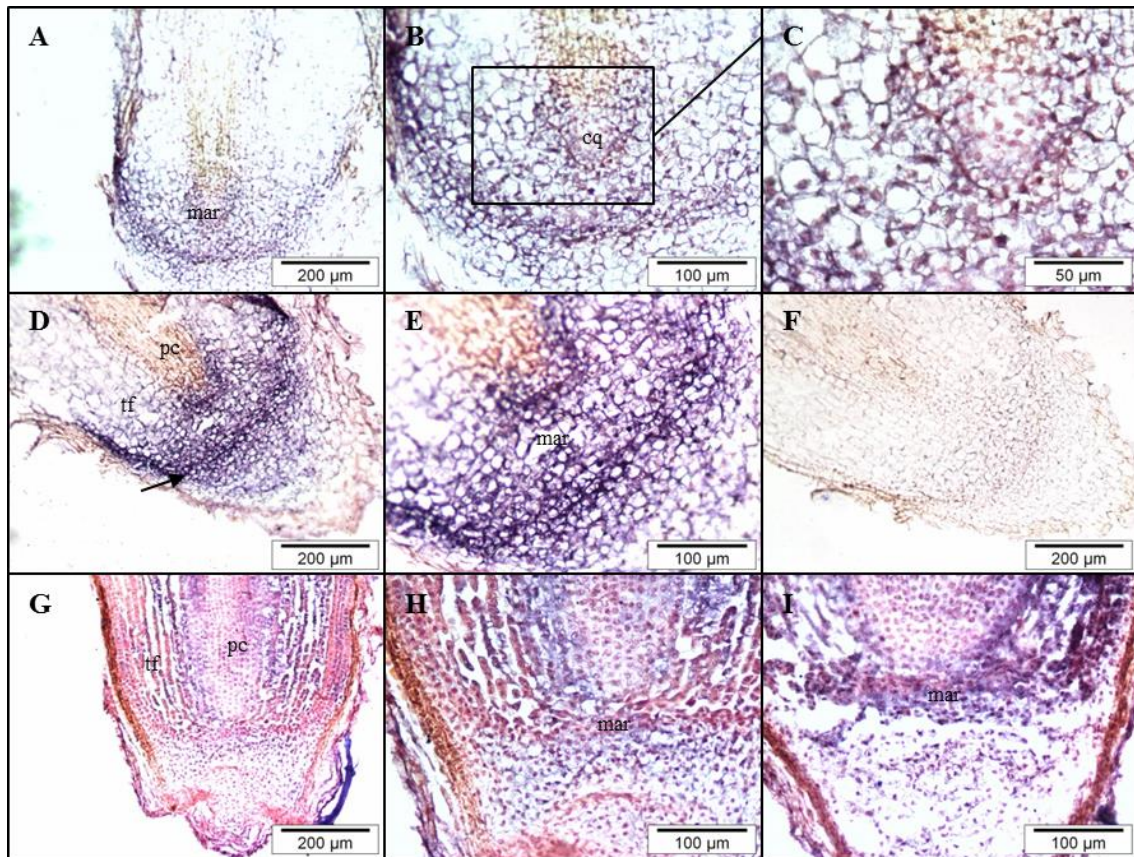


Figura 52.- Localización *in situ* del ARNm *CsSCL1* en secciones longitudinales de la zona apical de raíces desarrolladas a partir de brotes en multiplicación de castaño hibridadas con las sondas específicas antisentido (A, B, D, E, F, G, H e I) y sentido (C), no observándose señal en esta última. cq (centro quiescente); mar (meristemo apical de la raíz); pc (procambium); tf (tejido fundamental).

Para determinar el patrón de expresión del gen a lo largo del desarrollo de las RA, también se llevó a cabo la localización del transcrito *SCL1* en secciones longitudinales y transversales de las RA, incluyendo la zona de diferenciación donde se observa la emergencia de RL. La expresión del gen *CsSCL1* está asociada a la formación y desarrollo de los primordios de estas RL, con prácticamente ausencia de mensajero en el resto de los tejidos de las raíces. Así, el transcrito se localizó en las células del periciclo, tejido a partir del cual se diferencian los primordios de las RL, en la endodermis (flechas rojas) así como en el primordio de RL (Figura 53). En el primordio, el transcrito se localizó en las células iniciales del tejido fundamental y células del MAR así como en las células de la columela (Figura 53 B).

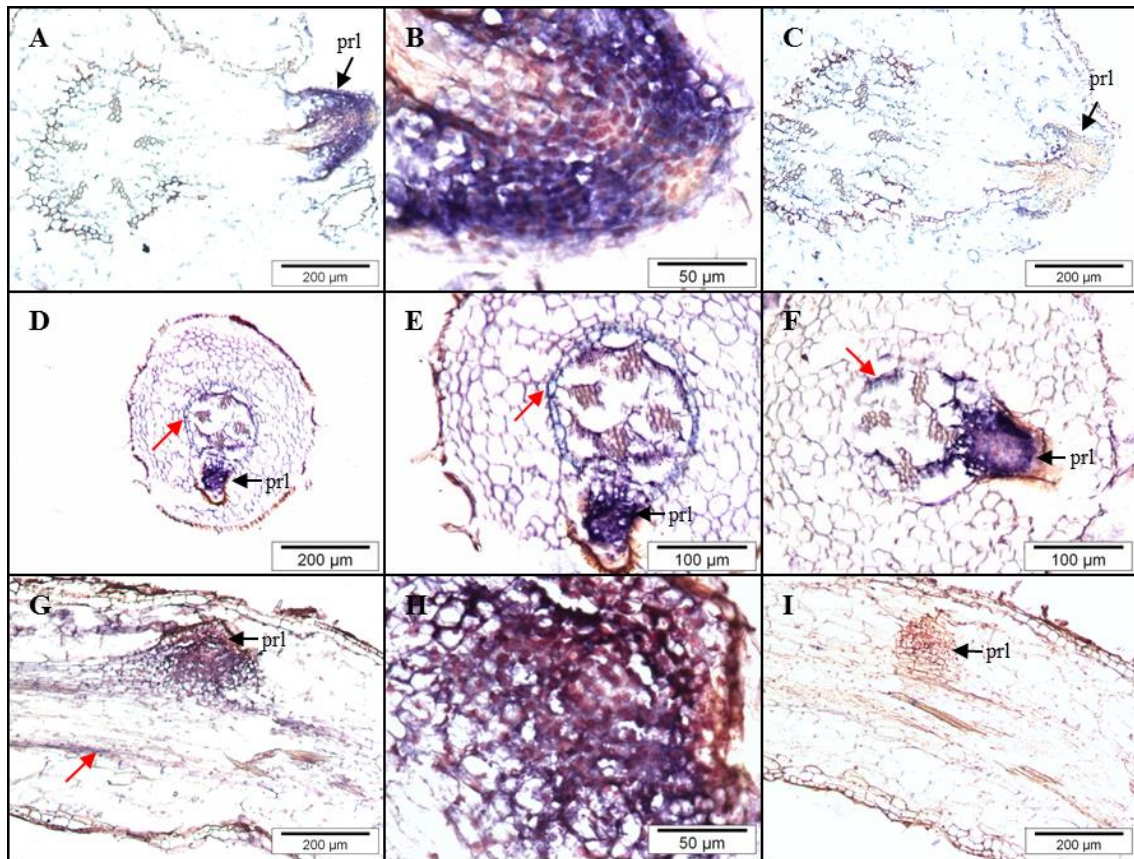


Figura 53.- Localización *in situ* del ARNm *CsSCL1* en secciones transversales (A, B, C, D, E y F) y longitudinales (G, H e I) de RAs desarrolladas en brotes de RB tratados con IBA donde se observa la presencia de RLs, hibridadas con las sondas específicas *SCL1* antisentido (A, B, D, E, G, H e I) y sentido (C y F). En las imágenes B y E se pueden observar con más detalle el primordio de RL desarrollado en las raíces A y D respectivamente. Nótese la ausencia de señal en los controles hibridados con la sonda sentido. prl (primordio de raíz lateral). las flechas rojas señalan la endodermis.

6.2.5 Análisis de la expresión del gen *CsSCL1* en el ápice de brotes de castaño

El análisis de la expresión del gen *CsSCL1* en brotes en multiplicación de castaño mostró una localización del transcrito en la capa más externa del MAB, en los primordios foliares (Figura 54 A y C) y en las yemas axilares (Figura 54 C y D). En el MAB y yemas axilares el transcrito se localizó en la capa más externa (L1) con un patrón de expresión similar en ambos órganos (Figura 54), de la misma manera que lo observado en las yemas axilares desarrolladas en la base del tallo de brotes de castaño (Figura 49).

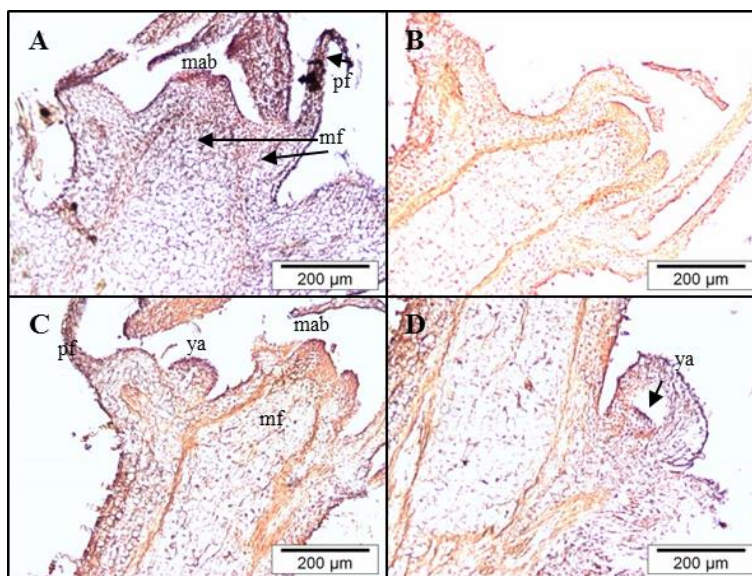


Figura 54.- Localización *in situ* del ARNm *CsSCL1* en secciones longitudinales de la parte apical del brote de castaño multiplicado *in vitro* hibridadas con la sonda específica antisentido (A y C) y sentido o control (B y D) donde no se observa expresión. mab (meristemo apical del brote); mf (meristemo fundamental); pf (primordio foliar); ya (yema axilar).

6.3 Discusión

El modelo del dominio GRAS de la proteína *CsSCL1* se obtuvo usando como molde la estructura obtenida experimentalmente del dominio GRAS de *OsSCL7* de arroz (Li *et al.*, 2016). La distribución de los motivos conservados y el patrón de α -hélices y láminas- β observada en nuestra estructura son similares a la de arroz. Esto tiene sentido, a pesar de tratarse de una monocotiledónea, debido a la enorme conservación que existe en este dominio en todas las proteínas GRAS de distintas especies. La proteína fue cristalizada en forma de dímero, puesto que las proteínas GRAS forman homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia GRAS, cuya característica parece ser importante para su función de regulación transcripcional (Itoh *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Gobbato *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2015). Se mostró que en la hendidura que se forma en el interior del dímero se puede acoplar ADN, lo que ayudará a estudiar los mecanismos preliminares de interacción de las proteínas GRAS con el ADN (Li *et al.*, 2016).

Durante el proceso de inducción embriogénesis el gen *CsSCL1* mostró una expresión abundante y específica en estructuras proembriónicas, lo cual sugiere que pueda estar participando en la adquisición y el mantenimiento de la competencia embriónica. La abundante expresión que se observa durante el desarrollo embrionario en la protodermis, tejido que mantiene la capacidad embriónica y a partir del cual se originan frecuentemente los embriones secundarios, así como

en las proembriones secundarios refuerza esta hipótesis. Otros genes con homología a *CsSCL1*, en pepino y especies forestales parecen estar implicados en la inducción de la ES (Stasolla *et al.*, 2003; Cairney *et al.*, 2006; Wiśniewska *et al.*, 2013). El gen *LISCL*, que es el que muestra mayor similitud con *CsSCL1*, no muestra mucha expresión en tejidos vegetativos, sin embargo parece ser importante durante la microsporogénesis de la antera induciendo un promotor asociado con la meiosis (Morohashi *et al.*, 2003). En el análisis de expresión de genes de la familia GRAS, realizado durante la ES y el EA en pino, uno de los genes analizados (*PrSCL10*) mostró, durante el desarrollo embrionario, los mayores niveles de expresión en masas embriogénicas (Abarca *et al.*, 2014), asociado a competencia embriogénica. Cabe mencionar de este estudio, la alta expresión detectada en embriones maduros del gen *PrSCL6* y *PrSCR* que incrementan considerablemente durante el desarrollo del embrión, manteniendo niveles altos en tejidos competente para enraizar. Cabe pensar que ese incremento en niveles de expresión pudiera estar asociado a una localización del transcrito en la zona de determinación de la futura raíz del embrión.

Por otra parte, *CsSCL1* se expresa abundantemente en embriones en estadios tempranos de desarrollo, tanto somáticos como zigóticos. Cuando se establece la simetría radial en el embrión, la expresión presenta una cierta polarización en dominios específicos que darán lugar a los futuros meristemas apical y radial, de manera similar al gen *ZmSCR* en maíz (Lim *et al.*, 2005), lo que hace pensar que el gen juega papeles claves en el establecimiento inicial del patrón tisular que controlará el desarrollo embrionario y postembrionario. El gen *PrSCL1* (ortólogo de *CsSCL1*) también parece estar implicado en el establecimiento temprano de los dominios tisulares y gradientes de hormonas (Abarca *et al.*, 2014). En general, los niveles de expresión del gen disminuyen y se localizan en tejidos específicos a partir del estadio globular, lo que sugiere que la actividad de *CsSCL1* en determinar los destinos celulares tiene lugar muy temprano durante el desarrollo. *AtSCR* también se expresa desde estadios globulares y participa en la división asimétrica que tiene lugar en la hipófisis en estos estadios y durante el desarrollo embriogénico se expresa en células que van a sufrir divisiones (Wysocka-diller *et al.*, 2000; Laux *et al.*, 2004). Posiblemente el gen *CsSCL1* está implicado en la regulación de las divisiones celulares de histodiferenciación embrionaria que originarán el patrón tisular, el cual determina el desarrollo postembrionario de la planta. El patrón radial de las plantas se establece durante la embriogénesis y se propaga durante el posterior desarrollo (Steeves y Sussex 1989) y los mismos genes que median este patrón radial en tejidos postembrionarios se activan ya durante la embriogénesis (Scheres *et al.*, 1995; Di Laurenzio *et al.*, 1996). Una vez que se establece el eje apical-basal durante la embriogénesis, la expresión de *CsSCL1* se localiza preferentemente en el polo radicular y parece estar asociada al tejido fundamental a medida que aumenta el estado de desarrollo de los embriones de manera similar a lo observado en pepino

(Wiśniewska *et al.*, 2013). Este patrón de expresión, se mantiene en el desarrollo posterior de la raíz, mostrando en ambos un patrón similar, lo cual sugiere que el gen *CsSCL1* podría actuar en la regulación del patrón radial de la raíz desde los estadios más tempranos del desarrollo de la planta. El patrón de expresión del gen *CsSCL1* durante la embriogénesis y tejidos postembrionarios, asociado al tejido fundamental y a sus células iniciales es similar al observado en *SCR* (Sabatini *et al.*, 2003). El gen *CsSCL1* podría también estar actuando el establecimiento de la identidad del tejido fundamental desde estadios tempranos del desarrollo.

La formación de RA en castaño es inducida por la aplicación de auxina exógena, (Sánchez y Vieitez 1991; Ballester *et al.*, 1999). En un análisis previo mediante qPCR, se demostró que los niveles de ARNm de *CsSCL1* aumentaban en respuesta a la aplicación de auxina exógena durante las primeras 24 horas del proceso de inducción de raíces en brotes RB (Sánchez *et al.*, 2007), momento en el que se produce la reorganización celular previa a la división celular (Ballester *et al.*, 1999). La expresión regulada por auxina, así como el tiempo de inducción del gen *CsSCL1* además de su expresión en raíces, sugieren una función de la proteína en señalización de auxinas asociada a EA. El papel de las proteínas GRAS en señalización de auxinas y desarrollo de raíces ya se ha descrito previamente (Bolle 2016). La expresión de *AtSCR* está asociada con la distribución de auxinas, que afecta a la especificación del destino celular en el meristemo radicular (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Sabatini *et al.*, 1999, 2003). Del mismo modo, el gen *BnSCL1* se induce por auxina y se expresa preferencialmente en raíces (Gao *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el control hormonal en la formación del tejido fundamental de la raíz actúa por medio de proteínas GRAS (Koizumi y Gallagher, 2013; Cederholm *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos de la expresión del gen *CsSCL1* en brotes RB (con capacidad de formar RA) y en brotes C (con baja capacidad de formar RA) son consistentes con una relación directa entre los niveles de ARNm localizados en tipos celulares específicos en los brotes RB tratados con auxina y la competencia de dichos brotes para la formación de raíces, y por lo tanto con la iniciación de primordio de la raíz. Esto indica un importante papel de este gen en determinar la entrada de ciertas células en la vía de diferenciación de la raíz y que darán lugar a las células iniciales del meristemo de las RA. La expresión localizada de *CsSCL1* en las células del procambium de los brotes RB tratados con IBA, parece ser crítica para el proceso de EA. Por otra parte la expresión más difusa y no específica en brotes de la copa tratados con IBA, puede estar relacionado con la formación de callo en dichos brotes en respuesta a la auxina. La aplicación de auxina exógena cambia el patrón de expresión génica de las células del cambium y células derivadas en RB, las cuales son capaces de establecer un nuevo programa dando lugar a la formación de RA. En muchas especies forestales, las RA se originan a partir de células

competentes adyacentes al cambium vascular (Baraldi *et al.*, 1995; Diaz-Sala *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2003), las cuales son capaces de cambiar su destino celular en respuesta al estímulo adecuado.

La localización específica y asimétrica del ARNm *CsSCL1* en las células del cambium, solo en los brotes RB tratados con auxina, indica que la regulación del gen *CsSCL1* depende del estado ontogénico del brote y del tipo celular y sugiere un importante papel del gen en la reorganización y diferenciación de estas células. Por ello, el gen podría estar implicado en la adquisición del destino celular de raíz, inducción y mantenimiento de las divisiones celulares asimétricas que darán lugar a los nuevos meristemas. Además la localización específica de ARNm *CsSCL1* en el primordio de la raíz y la ausencia de transcritos en el callo y otros tejidos basales de los brotes C después de 7 y 9 días del tratamiento con auxina, apoyan la hipótesis de que *CsSCL1* participe en el mantenimiento del meristemo de la raíz. Este patrón de expresión es similar a lo observado por Solé *et al.* (2008) en *P. radiata*, tanto para el gen *PrSCL1* (homólogo del gen *CsSCL1*) como para *PrSHR* (ortólogo de *AtSHR*), que parecen jugar un papel importante en los primeros estadios de formación de RA. *PrSCL1* se induce en respuesta a auxina exógena, pero la expresión de *PrSHR* es independiente de la auxina en la formación de RA. Parece que una de las características del cambium y de células con competencia para enraizar antes de la activación de las divisiones celulares que ocurren en el primordio de la RA es la capacidad de incrementar la expresión de determinados genes tanto en respuesta a auxina exógena, como en procesos independientes de esta (Solé *et al.*, 2008). Por otra parte, en brotes de pino no competentes para enraizar, no se observa ninguna localización específica de los genes *PrSHR* y *PrSCL1* de manera similar a lo que observamos en castaño para los brotes C (Abarca *et al.*, 2014). La formación de RA por lo tanto podría estar asociada con varias vías conectadas entre sí que incluyan la regulación transcripcional por parte de proteínas GRAS (como *CsSCL1*) y vías de señalización de auxinas (Sole *et al.*, 2008). *SHR* regula el desarrollo de RA en *Arabidopsis* (Lucas *et al.*, 2011) y también se ha demostrado que algunos genes *SCARECROW-LIKE* están implicados en la formación de RA en la planta modelo (Hochholdinger y Zimmermann, 2008). Tanto *SCL* como *SHR* actúan durante las primeras 24 horas después del tratamiento con auxina, durante la desdiferenciación pero antes de la división celular (Pijut *et al.*, 2011). Recientemente se ha caracterizado la familia GRAS en pino y se analizó la expresión de un subconjunto de genes durante el EA. Varios de estos genes se expresaban durante el EA de un modo dependiente de auxina, edad o desarrollo (Abarca *et al.*, 2014).

La expresión del gen *CsSCL1* durante la iniciación y desarrollo de RL es también consistente con el papel del gen en la formación del patrón radial. Las RL se originan a partir de células competentes del periciclo, que es la capa más externa del cilindro central. Esto sugiere, del

mismo modo que se observó en la formación de RA, que el gen puede desempeñar un papel en la inducción y mantenimiento de las divisiones asimétricas para dar lugar a la formación del meristemo de la RL. La localización del transcrito en el primordio de la raíz sugiere que el gen puede participar en el mantenimiento del meristemo de la RL. Se ha demostrado que varias proteínas GRAS están implicadas en la iniciación y el establecimiento del patrón del primordio de la RL y en el desarrollo de la misma (Lucas *et al.*, 2011; Battaglia *et al.*, 2014). En la raíz de *Cucumis sativa*, *SCR* se localizaba en el periciclo y endodermis del primordio de la RL en desarrollo. (Wiśniewska *et al.*, 2013).

La expresión de *CsSCL1* también parece estar asociada al meristemo fundamental, localizándose en las células iniciales y derivadas del mismo y en el córtex y la endodermis diferenciados. Este patrón de expresión asociado al tejido fundamental se observó para *SCR* en todas las especies estudiadas (Pysh *et al.*, 1999; Sassa *et al.*, 2001; Kamiya *et al.*, 2003; Sabatini *et al.*, 2003; Laajanen *et al.*, 2007; Sbabou *et al.*, 2010; Wiśniewska *et al.*, 2013). La expresión del gen *CsSCL1* asociada a estos tejidos sugiere que también podría estar implicado en el mantenimiento de la identidad de córtex y endodermis como ya se había planteado durante la embriogénesis. En casi todas las plantas, la endodermis puede dividirse repetidamente formando múltiples capas de córtex mientras que mantiene una única capa de endodermis. En *Arabidopsis* solo se produce una capa de córtex y una de Middle córtex (MC) (Cui *et al.*, 2016). El MC aparece cerca de los polos del xilema (Baum, 2002). En las secciones transversales de raíz (Figura 51) se observa expresión del gen *CsSCL1* en la endodermis y se pueden observar células en división activa que podrían estar formando nuevas capas de córtex, de acuerdo al papel de genes *SCR* y *SCL* en la formación de MC (Pauluzzi *et al.*, 2012; Choi y Lim, 2016). Los genes *SHR* y *SCR* también son necesarios para otorgar la identidad del CQ y mantener su actividad (Sabatini *et al.*, 2003; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000). Aunque en nuestro caso es difícil identificar el centro CQ, parece expresarse en el mismo y en las CM que lo rodean, que darán lugar mediante divisiones asimétricas a los distintos tejidos de la raíz, pudiendo ayudar al mantenimiento del meristemo. *SCR* mantiene las células iniciales del MAR y ayuda a mantener un meristemo funcional, así como también controla su tamaño mediante regulación génica (Wildwater *et al.*, 2005; Moubayidin *et al.*, 2016).

En brotes de *A. thaliana*, la expresión de *SCR* se establece en la capa L1 del MAB (Wysocka-Diller 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2005; Dhondt *et al.*, 2010; Gardiner *et al.*, 2011), al igual que ocurre en el MAB de los brotes de castaño. Hay varias proteínas GRAS implicadas en el desarrollo del MAB (Schulze *et al.*, 2010; Engstrom *et al.*, 2011) y en el desarrollo de los meristemos axilares (Lin *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). La localización del transcrito *CsSCL1* en la zona periférica del MAB y los primordios foliares, es consistente con el

patrón de expresión de otros genes de la familia GRAS y podrían sugerir que este gen desempeña una función en la formación de las hojas así como en mantenimiento del meristemo apical de la yema. SHR y SCR funcionan en el crecimiento de las hojas de *Arabidopsis* regulando la proliferación celular y su expresión en hojas se asocia con la actividad de división celular en la mayoría de los tipos celulares (Dhondt *et al.*, 2010). SCR y *SCL23* se expresan en células equivalentes a la endodermis en hojas y brotes (Cui *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2016).

El análisis mediante hibridación *in situ* de distintas estructuras como son RL, RA, yemas axilares y embriones somáticos y zigóticos muestra una localización preferencial del transcrito de *CsSCL1* en tejidos meristemáticos. Esto indica que el gen juega un papel importante en los procesos de reorganización y diferenciación de las células que darán lugar a nuevos tejidos, inducción y mantenimiento de las divisiones asimétricas que darán lugar a nuevos meristemos así como mantenimiento de los propios tejidos meristemáticos.

Cabe resaltar que el patrón de expresión del gen *CsSCL1* recuerda al del gen *CPE*, aunque en general la señal de hibridación es mucho más intensa en el caso de *SCL1*. Como ya se ha mencionado, algunas de las secciones utilizadas en ambos experimentos de hibridación son contiguas y se puede observar que la expresión de los genes en la capa L1 del MA de brotes y yemas es homóloga así como la expresión en la columela y células precursoras. Por otra parte, en el caso de embriones en estado cotiledonar avanzado el gen *SCL1* está asociado al tejido fundamental y el MR, mientras que la expresión de *CPE* está únicamente asociada a la futura columela. Además en el meristemo radicular, *CPE* no se expresa en el CQ mientras que la expresión de *CsSCL1* está al menos asociada al CQ. Dado que ambos genes, comparten ciertos dominios de expresión, aunque con cierta especificidad para cada uno de los genes, no podemos descartar que el gen *CPE* pueda estar en la cascada de señalización de *SCL1* bajo determinados estímulos.







7. Gen *TCTP* (Translationally Controlled Tumor Protein)

7.1 Introducción

Las proteínas TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) están codificadas por el gen *TCTP* y en eucariotas constituyen una familia de proteínas que no comparten similitud de secuencia con ninguna otra familia y que tampoco ha sido descrita en procariotas (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). Tienen un papel esencial en la regulación del crecimiento general controlando la proliferación y diferenciación celular (Bommer y Thiele, 2004; Hsu *et al.*, 2007; S. H. Chen *et al.*, 2007; Amson, Pece, *et al.*, 2013). TCTP es una proteína que está muy conservada y ha sido descrita en eucariotas, incluyendo hongos, levaduras, anélidos, cnidarios, insectos, plantas y mamíferos (Thaw *et al.*, 2001; Bommer y Thiele, 2004; Amson, Pece, *et al.*, 2013). Se le denominó “Translationally Controlled Tumor Protein”, porque su secuencia de ADNc se había aislado a partir de un tumor, aunque previamente su identificación ya había sido publicada en ratón (Chitpatima, 1988; Gross *et al.*, 1989). Este nombre inespecífico es el que aún se usa en general pero en la bibliografía se pueden encontrar otras denominaciones para TCTP como “histamine release factor” (HRF) o fortilin que enfatizan únicamente una función en particular (MacDonald *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001). En general se considera a TCTP como una proteína citoplasmática, pero también se ha visto que se localiza en el núcleo, en el retículo endoplasmático, membranas mitocondriales o tanto en el núcleo como en el citoplasma (Li *et al.*, 2001; Cans *et al.*, 2003; Arcuri *et al.*, 2004; Susini *et al.*, 2008; Rid *et al.*, 2010; Diraison *et al.*, 2011; Baylot *et al.*, 2012; Ma y Zhu, 2012; Tao *et al.*, 2015), pudiendo también ser secretada (MacDonald *et al.*, 1995; Amzallag *et al.*, 2004; Lespagnol *et al.*, 2008). Existe una relación entre la localización de TCTP y su función (Ma y Zhu, 2012). Hay un número variable de pseudogenes y genes *TCTP* en los genomas de diferentes organismos, siendo mayor en mamíferos que en plantas y hongos, que en general contienen uno o dos genes TCTP (Thiele *et al.*, 2000; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

TCTP fue descubierta de manera independiente hace más de 30 años por tres grupos interesados en genes regulados a nivel traduccional y la denominaron Q23 (Thomas *et al.*, 1981), P21 (Yenofsky *et al.*, 1982, 1983) y P23 (Benndorf *et al.*, 1988) en base a su peso molecular. Estos autores sugirieron que esta proteína estaba regulada a nivel traduccional y relacionada con proliferación en células tumorales de animales. Posteriormente se comprobó que TCTP se expresaba en muchos tejidos de manera dependiente del tipo celular/tisular y del estado de desarrollo (Hughes *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1997) y que estaba regulada tanto a nivel

transcripcional como traduccional (Bommer y Thiele, 2004; Nagano-Ito y Ichikawa, 2012; Amson, Pece, *et al.*, 2013). Además TCTP está regulada por diversas condiciones celulares y estímulos (Stürzenbaum *et al.*, 1998; Teshima *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999; Oikawa *et al.*, 2002; Diraison *et al.*, 2011) y por medio de interacciones con otras proteínas (Zhang *et al.*, 2002; Baylot *et al.*, 2012).

La región flanqueante 5' del gen *TCTP* tiene una caja TATA, elementos promotores para una gran variedad de factores de transcripción, además de varios sitios de unión conservados (Thiele *et al.*, 1998; Andree *et al.*, 2006; Amson *et al.*, 2012). Se generan dos tipos diferentes de ARNm que difieren en la longitud de sus regiones 3'UTR, debido al uso de dos señales de poliadenilación alternativas, y se transcriben en todos los tejidos investigados aunque en proporciones diferentes, siendo normalmente el corto el más abundante. Esto indica un extensivo control transcripcional e implicación de factores específicos de tejido (Thiele *et al.*, 2000; Bommer *et al.*, 2002). El ARNm de *TCTP* tiene un alto grado de estructura secundaria y muestra características típicas de control traduccional como un tramo 5'oligopirimidina (5'-TOP) y una región 5'-UTR con elevado contenido CG (Bommer *et al.*, 2002, 2010) y la región 3'UTR tiene regiones ricas en AU y elementos AUUUA (Bommer *et al.*, 2002; Bommer y Thiele, 2004).

7.1.1 TCTP en animales

Ya desde su descubrimiento en células tumorales, TCTP ha sido asociada con el cáncer, y se ha estudiado su implicación en diversos tipos de esta enfermedad (Bommer, 2012; Koziol y Gurdon, 2012; Acunzo *et al.*, 2014; Hou y Zhai, 2015). De hecho, en los últimos años se ha investigado en su utilización como diana terapéutica para el tratamiento de cáncer (Acunzo *et al.*, 2014; Kadioglu y Efferth, 2016; Seo y Efferth, 2016). Sin embargo TCTP es una proteína multifuncional implicada en numerosos procesos biológicos, lo cual se infiere por su capacidad de interactuar con diversas proteínas incluyendo entre otras microtúbulos, filamentos de actina y el huso mitótico (Chan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Su papel preciso no está todavía esclarecido ya que los mutantes son pleiotrópicos, pero está bastante aceptada su implicación en proliferación celular y desarrollo (Amson, Pece, *et al.*, 2013). Diversos estudios mostraron que está implicada en el control de la progresión del ciclo celular, en base a su asociación con microtúbulos durante la mayor parte del ciclo celular y su unión al huso mitótico (Gachet *et al.*, 1999; Bazile *et al.*, 2009). TCTP también se asocia con los filamentos de actina y esto, junto con una implicación en la regulación de la forma celular, asocian a TCTP con la integración de las interacciones citoesqueléticas (Bazile *et al.*, 2009; Tsarova *et al.*, 2010).

Dado que es un regulador del crecimiento celular, su sobreexpresión o silenciamiento conlleva defectos de crecimiento (Hsu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Debido a las similitudes estructurales entre las familias de chaperonas Mss4/Dss4 y TCTP, se cree que TCTP se puede unir a GTPasas, actuando bien como factor de intercambio de guanina (GEF) o como chaperona guanine nucleotide-free (GFC) en la interacción con las proteínas de la superfamilia Ras GTPasas (Thaw *et al.*, 2001; Itzen *et al.*, 2006). TCTP activa a las proteínas Ras y juntas regulan a la quinasa TOR Ser/Thr, que a su vez regula el crecimiento celular en respuesta a estímulos externos e internos (Wullschleger *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2007). La vía de señalización TOR (target of rapamycin) es el mayor regulador de crecimiento celular en animales y hongos (Sabatini, 2006).

TCTP es además, una proteína de unión a calcio, a pesar de no pertenecer a ninguna familia típica de proteínas de unión a calcio, y podría tener un papel en la homeostasis intracelular de este elemento (Haghighat y Ruben, 1992; Graidist *et al.*, 2007). Por otra parte se ha visto que TCTP puede actuar tanto como proteína antiapoptótica como proapoptótica, mediante interacción con proteínas de la familia antiapoptótica Bcl-2 (MCL1, Bcl-xL o Bax) y con la proteína pro-apoptótica supresor de tumor p53 (Amson *et al.*, 2012). También protege a las células de la muerte celular inducida por choque térmico, por estrés oxidativo y por calcio (Graidist *et al.*, 2007; Acunzo *et al.*, 2014).

En ciertos casos, esta proteína desarrolla funciones en el exterior de la célula secretándose por una vía no clásica (Kim *et al.*, 2011), con implicación en varios procesos inflamatorios, ya sea funcionando como factor de liberación de histamina o como modulador de la secreción de citoquinas (Macdonald, 2012). Además TCTP de organismos parásitos está involucrado en ciertos procesos patológicos en el hospedador infectado y en el desarrollo de resistencia a drogas (Bhisutthibhan *et al.*, 1998). TCTP también está implicada en respuestas de defensa mediadas por ARNdc (Bommer *et al.*, 2002) y tiene un importante papel en la detección de daño de ADN y su reparación (Zhang *et al.*, 2012). Por otra parte TCTP inhibe la actividad ATPasa de la bomba de sodio potasio manteniendo así la homeostasis iónica en la célula (Kim *et al.*, 2009) y está implicada en el mantenimiento de la pluripotencia y renovación de las CM así como en la reprogramación nuclear (Kozioł *et al.*, 2007).

7.1.2 TCTP en plantas

Los estudios realizados en plantas, en la mayoría de los casos se han llevado a cabo en *Arabidopsis*. Aunque la función molecular de TCTP en plantas no ha sido completamente establecida todavía, parece que en términos generales TCTP muestra funciones similares en animales y plantas. Por ejemplo, la regulación del crecimiento y desarrollo parece estar conservada a través de los distintos reinos (Brioudes *et al.*, 2010). La primera secuencia de

TCTP vegetal se aisló a partir de una librería de ADNc preparada a partir de un cultivo de suspensiones celulares en alfalfa durante la inducción de embriones somáticos (Pay *et al.*, 1992) y la primera caracterización de un TCTP vegetal en plantas superiores fue en *Pharbitis* (Sage-Ono y Ono, 1998). La expresión de TCTP está regulada en respuesta a un amplio rango de estímulos y condiciones fisiológicas en plantas, lo que indica su control transcripcional, como luz, diferentes estreses bióticos y abióticos, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, fertilización del óvulo, el estado de maduración en los frutos o infección por patógenos así como reguladores de crecimiento como auxinas, ABA y metil jasmonato (ver Tabla 15).

Actualmente, se han aislado y clonado varios genes TCTP de diferentes especies vegetales, sin embargo hay pocos estudios respecto a su caracterización funcional. En la Tabla 15 se indican las funciones de TCTP identificadas en diferentes especies vegetales. TCTP no solo regula el crecimiento general sino que también lleva a cabo funciones que son específicas para plantas, como homeostasis de auxinas, regulación del cierre de los estomas, respuestas de defensa a virus y patógenos bacterianos, respuesta a estreses, crecimiento de tubo polínico, desarrollo del gametófito masculino, entre otras (Berkowitz *et al.*, 2008; Santa Brígida *et al.*, 2014). De manera similar a lo descrito en animales, en vegetales TCTP tiene también propiedades de unión a tubulina y a calcio, control de la progresión del ciclo celular o regulación de la apoptosis (Nakkaew *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2015). Se detectó tanto mensajero como proteína TCTP en la savia del floema, donde interactúa con otras proteínas regulando su destino, por lo que parece estar implicada en el movimiento a larga distancia, de manera similar a HRF en el suero de animales, sugiriendo un papel en señalización a larga distancia (Toscano-Morales *et al.*, 2014, 2015; Du *et al.*, 2015). TCTP es un regulador central del crecimiento y el desarrollo en plantas con papel en el control de la proliferación celular y parece tener una función similar a los sistemas no vegetales como mediador de la actividad de TOR, con la auxina como posible molécula de señalización de la ruta (Berkowitz *et al.*, 2008; Brioudes *et al.*, 2010).

Tabla 15.- Lista de genes TCTP presentes en diferentes especies de plantas y sus funciones

Especie	Gen	Nº de acceso	Función
<i>P. sativum</i>	<i>PsCaP23</i>	L47968	Proliferación celular (Woo y Hawes, 1997).
<i>Pharbitis</i>	<i>PnTCTP</i>	AB007759	Fotoperiodo y floración (Sage-Ono y Ono, 1998).
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>HevTCTP</i>	AF091455	Funciones biológicas asociadas a reacciones bioquímicas específicas del látex (Han <i>et al.</i> , 2000).
<i>G. max</i>	<i>GmTCTP</i>	AF4211558	Resistencia al aluminio (Ermolayev <i>et al.</i> , 2003).
<i>N. tabacum</i>	<i>NtTCTP</i>	AF107842	Mediar la transformación de <i>Agrobacterium</i>

			<i>tumefaciens</i> (Veena <i>et al.</i> , 2003).
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeTCTP</i>	AAM55492	Formación de raíces de almacenamiento (de Souza <i>et al.</i> , 2004).
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaTCTP</i>	AAM34280	Fertilización del óvulo (Sprunck <i>et al.</i> , 2005).
<i>C. maxima</i>	<i>CmTCTP</i>	DQ304537	Función externa a la célula y movimiento a larga distancia de proteínas floemáticas (Aoki <i>et al.</i> , 2005).
<i>Fragaria ananassa</i>	<i>FaTCTP</i>	Z86091	Maduración del fruto (Lopez y Franco, 2006).
<i>P. persica</i>	<i>PpT-C</i>		Respuesta a tratamiento con frío (Bassett <i>et al.</i> , 2006).
<i>Cucurbita maxima</i>	<i>CmTCTP</i>	DQ304537	Respuesta a infección CMV (Hinojosa-Moya <i>et al.</i> , 2006).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP</i>	At3g16640	Establecimiento de la enfermedad en hojas durante la infección con <i>Pseudomonas syringae</i> (A. M. E. Jones <i>et al.</i> , 2006).
<i>Bambusaedulis</i>	<i>BeTCTP</i>	DV668272	Fotosíntesis (Lin <i>et al.</i> , 2006).
<i>R. communis</i>	<i>RcTCTP</i>	RCOM_1433410	Formación de endospermo (Lu <i>et al.</i> , 2007).
<i>V. vinifera</i>	<i>VvTCTP</i>	gi 549063	Respuesta a déficit de agua y estrés salino (Vincent <i>et al.</i> , 2007).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP1</i>	At3g16640	Regulación del crecimiento, mediación de la actividad TOR, homeostasis de auxinas, desarrollo de pelos radiculares, desarrollo de raíces e inducción de RLs (Berkowitz <i>et al.</i> , 2008).
<i>O. sativa</i>	<i>OsTCTP</i>	DW246113	Respuestas de defensa a <i>Rhizoctonia solani</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2008).
<i>Sesbania drummondii</i>	<i>SdTCTP</i>		Respuestas a exposición a mercurio (VenKatachalam <i>et al.</i> , 2009).
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SITCTP</i>	AAT65968	Respuesta a la infección por un Potyvirus (Alfenas-Zerbini <i>et al.</i> , 2009).
<i>O. sativa</i>	<i>OsTCTP</i>	ABA95199	Componente en la respuesta de defensa frente a un elicitor del hongo <i>Magnaporthe grisea</i> (Liao <i>et al.</i> , 2009).
<i>Z. mays</i>	<i>ZmTCTP</i>	DN207011	Iniciación de la hoja de manera independiente del transporte de auxinas (Brooks <i>et al.</i> , 2009).
<i>T. aestivum</i>	<i>WbTCTP</i>	AF508970	Resistencia al mildiu (Li <i>et al.</i> , 2010).
<i>B. oleracea</i>	<i>BoTCTP</i>	AF418663	Regulación del crecimiento y respuestas de defensa frente a estrés por frío, altas temperaturas y salinidad (Cao <i>et al.</i> , 2010).
<i>Elaeis guineensis</i>	<i>EgTCTP</i>	AAQ87663	Crecimiento celular y progresión del ciclo celular (Nakkaew <i>et al.</i> , 2010).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP1</i>	NM112537	Regulación del crecimiento mitótico y

			duración del ciclo celular (Brioudes <i>et al.</i> , 2010).
<i>N. tabacum</i>	<i>NtTCTP</i>	AF107842	Progresión del ciclo celular (Brioudes <i>et al.</i> , 2010).
<i>T. aestivum</i>	<i>TaTCTP</i>	gi 75246527	Respuesta a elevadas temperaturas (Yang <i>et al.</i> , 2011).
<i>J. curcas</i>	<i>JcTCTP</i>	EF091818	Regulación del desarrollo del endospermo (Qin <i>et al.</i> , 2011).
<i>O. sativa</i>	<i>OsTCTP</i>	BAA02151	Contribución a la resistencia a mercurio en raíces (Wang <i>et al.</i> , 2012).
<i>Bambusa oldhamii</i>	<i>BoTCTP</i>	EE661600	Crecimiento (Yeh <i>et al.</i> , 2013).
<i>H. brasiliensis</i>	<i>HbTCTP1</i>	JN200814	Relacionado con TPD (“tapping panel dryness”). Respuesta a sequía, bajas temperaturas, alto contenido en sal, ethrel (ET), herida, metiljasmonato (Me-JA) y H ₂ O ₂ . Protección frente a daños causados por generación de especies reactivas de oxígeno. Propiedades de unión a calcio (D. Li <i>et al.</i> , 2013).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP</i>	NM112537	Tolerancia a la sequía, cierre de estomas mediado por ABA, propiedades de unión a calcio y a tubulina (Kim <i>et al.</i> , 2012).
<i>N. benthamiana</i>	<i>NbTCTP</i>	AB780363	Regulación de la muerte celular durante la respuesta hipersensitiva (HR) a respuestas de defensa asociadas a muerte celular (Gupta <i>et al.</i> , 2013).
<i>Larix leptolepis</i>	<i>LaTCTP</i>	KC250016	Regulación del desarrollo del embrión somático a través de la regulación de PCD en respuesta a hormonas (Zhang <i>et al.</i> , 2013).
<i>P. sativum</i>	<i>PsTCTP</i>	P50906	Respuesta a estrés por frío en raíces (Badowiec <i>et al.</i> , 2013).
<i>C. maxima</i>	<i>CmTCTP</i>	DQ304537	Regulación del crecimiento (de la diferenciación) posiblemente a través de señalización a larga distancia (Hinojosa-Moya <i>et al.</i> , 2013).
<i>N. benthamiana</i>	<i>NbTCTP</i>	AB780363	Formación de complejos de proteínas que contribuyen a la infección del virus PepYMV (Bruckner <i>et al.</i> , 2013).
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SlTCTP</i>	AAT65968	Respuesta a estrés por plomo (Pérez <i>et al.</i> , 2013).
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>MoTCTP</i>	KC834738	Control del desarrollo, formación y germinación de conidios. Resistencia frente a estreses celulares en el hongo del arroz. (Lilin <i>et al.</i> , 2013).
<i>G. max</i>	<i>GmTCTP</i>	gi 20140683	Respuesta a la infección de hojas con

			<i>Phakopsorapachyrhizi</i> (Pereira <i>et al.</i> , 2013).
<i>H. vulgare</i>	<i>HvTCTP</i>	Q9M5G3	Respuesta a sequía (Ghabooli <i>et al.</i> , 2013).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP1</i>	At3g16640	Efectos citoprotectores. Habilidad de unir calcio en el citosol. Inhibición de la apoptosis (Hoepflinger <i>et al.</i> , 2013).
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>GhTCTP1</i>	KC787689	Regulación de la tolerancia a áfidos (Zhang <i>et al.</i> , 2014).
<i>B. campestris</i>	<i>BcTCTP</i>	gij20140684	Respuesta al tratamiento con Gly-N en hojas y raíces (Wang <i>et al.</i> , 2014).
<i>Z. mays</i>	<i>ZmTCTP</i>	gi 195605582	Regulación de la PCD después de estrés por inundación con un posible papel de H ₂ O ₂ en la inducción de TCTP (Chen <i>et al.</i> , 2014).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP2</i>	At3g05540	Función externa a la célula basada en la capacidad de movimiento a larga distancia en tabaco, posiblemente a través del floema. Correlación entre la presencia de AtTCTP2 y la aparición de raíces aéreas (Toscano-Morales <i>et al.</i> , 2014).
<i>M. esculenta</i>	<i>MeTCTP</i>	AAM55492	Protección contra estrés salino (Santa Brígida <i>et al.</i> , 2014).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP2</i>	At3g05540	Señalización a larga distancia. Inducción de RAs a través de su transporte a larga distancia (Toscano-Morales <i>et al.</i> , 2015).
<i>A. thaliana</i>	<i>AtTCTP2</i>	KR261461	Implicación en reproducción vegetativa mejorando la regeneración de planta de tabaco <i>in vitro</i> (Toscano-morales <i>et al.</i> , 2015).
<i>N. tabacum</i>	<i>NtTCTP</i>	KM507327	Interacciona con el receptor de etileno NTHK1 y mejora el crecimiento de la planta a través de la promoción de la proliferación celular. Protege a NTHK1 de sufrir la degradación de proteínas mediada por proteosoma (Tao <i>et al.</i> , 2015).
<i>H. vulgare</i>	<i>HvTCTP</i>	Q9M5G3	Respuesta a estrés salino (Mostek <i>et al.</i> , 2015).
<i>O. sativa</i>	<i>OsTCTP</i>	Os11g43900	Tolerancia al mercurio (Wang <i>et al.</i> , 2015).
<i>O. sativa</i>	<i>OsTCTP</i>	Os11g43900	Respuesta al insecto pulgón pardo (Du <i>et al.</i> , 2015).
<i>R. pseudoacacia</i>	<i>Rpf41</i>	KJ083257	Regulación de la nodulación simbiótica, implicado en la diferenciación celular simbiótica y en prevenir el envejecimiento prematuro de los nódulos jóvenes (Chou <i>et al.</i> , 2015).
<i>S. lycopersicum</i>	<i>SITCTP</i>	AAT65968	Regulador del crecimiento necesario para la infección por un potyvirus (Bruckner <i>et al.</i> ,

			2016).
<i>N. benthamiana</i>	<i>NbTCTP</i>	AB780363	Necesario para la infección por un potyvirus (Bruckner <i>et al.</i> , 2016).
<i>H. brasiliensis</i>	<i>HbTCTP</i>	FJ156098	Respuesta a sequía, bajas temperaturas, alto contenido en sal, etileno (ET), herida, metiljasmonato (Me-JA) y H ₂ O ₂ . Asociado con TPD (“tapping panel dryness”). Interacción con proteínas. Protección frente a daños causados por generación de especies reactivas de oxígeno (Deng <i>et al.</i> , 2016).

7.2 Resultados

7.2.1 Aislamiento y caracterización de las secuencias de *CsTCTP*, *OsTCTP* y *OrTCTP*

Para la obtención de la secuencia nucleotídica de gen *TCTP* en castaño se diseñaron cebadores específicos (TCTP F1 y TCTP R1, Tabla 2, material y métodos) a partir de secuencias obtenidas de la base de datos de Fagáceas (<http://www.fagaceae.org/>) que tenían homología con genes *TCTP*. Mediante la técnica RACE 3' y 5', usando como molde un ADNc de embriones somáticos de castaño y los cebadores diseñados, y posteriormente otros diseñados sobre las secuencias de los fragmentos obtenidos (TCTP F2 y TCTP F3, Tabla 2, material y métodos), se obtuvo la secuencia de *CsTCTP* (*C. sativa TCTP*) mediante el ensamblaje de las secuencias de los productos de RACE. Sobre esta se diseñaron los cebadores TCTPq F y TCTPq R (Tabla 12, material y métodos) para usarlos en el análisis de qPCR. La secuencia de *QsTCTP* (*Q. suber TCTP*) se obtuvo mediante ensamblaje de las secuencias de los fragmentos obtenidos de una reacción RACE 3' con el cebador TCTP F2 y de una PCR con los cebadores TCTP F3 y TCTP R1, en las que se usó como molde un ADNc obtenido de embriones somáticos de alcornoque. La secuencia de la de *QrTCTP* (*Q. robur TCTP*) se obtuvo por medio de PCR usando los cebadores TCTP F3 y TCTPq R y un ADNc obtenido a partir de embriones somáticos de roble. Las tres secuencias obtenidas tenían elevada homología con genes *TCTP* identificados en otras especies según se pudo comprobar mediante análisis BLAST en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

En la Figura 55 se representa la secuencia completa de ADNc de *CsTCTP*. Esta secuencia tiene 869 pb con un codón de iniciación (ATG) en la posición 116 pb y un codón de terminación TAA en la posición 620 pb, a partir del extremo 5' de la secuencia. Contiene una ORF de 507 pb que codifica una proteína de 168 aminoácidos, con un punto isoeléctrico de 4.52 y un peso molecular de 18,996 kDa. La secuencia *CsTCTP* muestra una región 5' no traducida (UTR) de

115 pb y una región 3'UTR de 247 pb. La región 3'UTR presenta una potencial señal de poliadenilación AATAA localizada 195 pb después del codón de stop, además de una cola de Poli-A con 19 residuos de adenina. En la Figura 56 se representa la secuencia obtenida de ADNc de *QsTCTP*. Esta secuencia tiene 723 pb comenzando con el codón de iniciación ATG y con un codón de terminación TAA en la posición 505 pb, a partir del extremo 5' de la secuencia. El ORF de la secuencia consta de 507 pb y codifica una proteína de 168 aminoácidos con un punto isoelectrico de 4.57 y un peso molecular de 18,921 kDa. La secuencia muestra una región 3' UTR de 219 pb con una potencial señal de poliadenilación AATAA localizada 167 pb después del codón de stop y una cola de Poli-A de 27 residuos de adenina. En la Figura 57 se representa la secuencia obtenida del ADNc de *QrTCTP* de 786 pb, con un codón de iniciación ATG en la posición 110pb y un codón de terminación TAA en la posición 614 pb desde el inicio de la secuencia. El ORF consta de 507 pb y codifica una proteína de 168 aa, con un punto isoelectrico de 4.58 y un peso molecular de 18,956 kDa. La secuencia *QrTCTP* identificada presenta una región 5' no traducida (UTR) de 109 pb y una región 3'UTR de 170 pb incompleta, ya que no contiene la cola de poli-A.

En las secuencias de aminoácidos deducidas de *CsTCTP*, *QsTCTP* y *QrTCTP* se buscaron motivos conservados para poder inferir las potenciales funciones de esta proteína. Según la herramienta ScanProsite las proteínas *CsTCTP* y *QrTCTP* muestran cuatro potenciales sitios de fosforilación, dos para la caseína quinasa II (9-12 y 135-238) y dos para la proteína quinasa C (73-75 y 99-101). En la proteína *QsTCTP* el segundo sitio de fosforilación para la caseína quinasa II está ausente. Las tres proteínas también presentan las secuencias características TCTP1 (45-55) y TCTP2 (125-147) que son típicas de la familia TCTP y dos potenciales sitios de miristoilación (46-51 y 141-146) que se superponen con TCTP1 y TCTP2 (Figura 55, Figura 56 y Figura 57).

t

```
ctcacgctctctcaatctcaaattctctgtgaattcaaaaacctctctctctctctgtgt
tttcttcaattctcattcgaatttcaattcctctacgctcaaaaaaccacaaccatgcta
                                     M L
gtttatcaggatcttctcactgctgatgagcttctctcggactcattcccatacaaggaa
V Y Q D L L T A D E L L S D S F P Y K E
attgaaaatgggatgctgtgggaagtggaggaaagtgggttgttcaaggagcagtcgat
I E N G M L W E V E G K W V V Q G A V D
gtagacattggggctaacccttctgcagaaggtggaggatgaaggtgttgatgac
V D I G A N P S A E G G G E D E G V D D
caagctgtcaagggttgtcgacattgttgacacctttcggcttcaggaacaacctgctttt
Q A V K V V D I V D T F R L Q E Q P A F
gacaagaagcagtttgtcacattcatgaagaggtacatcaagaatctgacacccaaattg
D K K Q F V T F M K R Y I K N L T P K L
gaggcagacaagcaagagttgtttaagaagcacattgagggagcaaccaagttcctcctt
E A D K Q E L F K K H I E G A T K F L L
tcaaagctcagtgacctccaattttttgtgggggaaagcatgcatgatgatggtggtttg
```

S K L S D L Q F F V G E S M H D D G G L
 gtgtttgcctactacaaggaaggtgcaactgatccaacctttatctactttgcatatgga
 V F A Y Y K E G A T D P T F I Y F A Y G
 ctgaaggaaatcaagtgt **taa**acattttacatggtgatctttcttttagttttagttctaag
 L K E I K C
 ttatcagtattttatatttttctcttttcttttggaaacctgtggaagataagggtatagttc
 aatctaagagtatttggtttttgagttttgttctattactacatgttcttctggtggtggt
 gatggttagaggattttatatacatatctcagttgagg **aataa**aaatataaaaatgtgtgttt
 tgttcaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 55.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc de *CsTCTP*. Se colorean en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAA) y en azul la potencial señal de poliadenilación (AATAA). Las flechas indican los cebadores usados en los análisis de qPCR. En la secuencia aminoacídica se localizan los dominios TCTP1 (violeta) y TCTP2 (azul). Se muestran los sitios de N-miristoilación (subrayado doble), así como los sitios de fosforilación para la caseína quinasa II (subrayado simple) y para la proteína quinasa C (subrayado ancho).

tcacgctctctcaatctcaaattctctgtgaattcaaaaacatctctctcttttttctt
 caattctcattcaaatttcaattcctctaagctcaaaaagccacaacc **atg**ctagtttat
 M L V Y
 caggatcttctcactgctgatgagcttctctcggactcattcccatacaaggaaattgaa
 Q D L L T A D E L L S D S F P Y K E I E
 aatgggatgctgtgggaagtgggaaggaaagtgggtttgttcaaggagcagttgatgtagac
 N G M L W E V E G K W V V Q G A V D V D
 attggggctaacccttctgcagaaggtggaggtgaggatgaagggtgttgatgaccaagct
 I G A N P S A E G G G E D E G V D D Q A
 gtcaagggttgctcgacattgttgacaccttttaggcttcaggaacaacctgcttttgacaag
 V K V V D I V D T F R L Q E Q P A F D K
 aagcagtttgtcacattcatgaagaggtacatcaagaatctgacacccaaactggaggca
 K Q F V T F M K R Y I K N L T P K L E A
 gacaagcaagagttgtttaagaagcacattgagggagcaaccaagttcctcctctcaaag
 D K Q E L F K K H I E G A T K F L L S K
 ctcaagtgcctccaattttttgtgggggaaagcatgcatggtgatggtggtttgtgttt
 L S D L Q F F V G E S M H G D G G L V F
 gcctactacaaggaaggcgcaactgatccaacctttatctactttgcatatggactgaag
 A Y Y K E G A T D P T F I Y F A Y G L K
 gaaatcaagtgt **taa**acattttacatggtgatcttcttttagatttagttcttagttattt
 E I K C
 tatcagaatatatatttttctcttttcttttggaaacctgtggaagagaaggggtatagtttt
 aatataggagagtggtgggtttttgagtttgtgctctaccaccacgtgcgtcgtggggggggg
 gt **aataa**taaacccccctttctctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 56.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc de *QsTCTP*. Se colorean en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAA) y en azul la potencial señal de poliadenilación (AATAA). En la secuencia aminoacídica se localizan los dominios TCTP1 (violeta) y TCTP2 (azul). Se muestran los sitios de N-miristoilación (subrayado doble), así como los sitios de fosforilación para la caseína quinasa II (subrayado simple) y para la proteína quinasa C (subrayado ancho).

ctcacgctctctcaatctcaaattctctgtgaattcaaaaacctctctctcttttttctt

```

caattctcattcaaatttcaattcctctaagctcaaaaaaccacaaccatgtagtttat
                                                                M L V Y
caggatcttctcactgggtgatgagcttctctcggactcattcccatacaaggaaattgaa
Q D L L T G D E L L S D S F P Y K E I E
aatgggatgctgtgggaagtggaaggaaagtgggttgttcaaggagcagtcgatgtagac
N G M L W E V E G K W V V Q G A V D V D
attggggctaacccttctgcagaaggtggaggtgaggatgaaggtgttgatgaccaagct
I G A N P S A E G G G E D E G V D D Q A
gtcaaggttgttgacattgttgacacctttaggcttcaggaacaacctgttttgacaag
V K V V D I V D T F R L Q E Q P A F D K
aagcagtttgtcacattcatgaagaggtacatcaagaatctgacacccaaattggaggca
K Q F V T F M K R Y I K N L T P K L E A
gacaagcaagagttgtttaagaagcacattgagggagcaaccaagttcctcctctcaaag
D K Q E L F K K H I E G A T K F L L S K
ctcagtgcacctccaatttttgtgggggaaagcatgcatgatgatggtggttgggtgtt
L S D L Q F F V G E S M H D D G G L V F
gccactacaaggaaggcgcaactgatccaacctttatctactttgcatatggactgaag
A H Y K E G A T D P T F I Y F A Y G L K
gaaatcaagtgttaaaaatttacatggtgatcttccttttagttaggttaggttatttt
E I K C
atcagtattttatattttttnnctctttccttttggaaacttgtggaagatcagggtatagttcg

atctaagagtattggnnttttgagttttgttctattgctacatgttcttctggtggtggtg

atgtt

```

Figura 57.- Secuencia de nucleótidos (representada en minúscula) y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (representada en mayúscula) del ADNc de *QrTCTP*. Se colorean en rojo los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAA). En la secuencia aminoacídica se localizan los dominios TCTP1 (violeta) y TCTP2 (azul). Se muestran los sitios de N-miristoilación (subrayado doble) así como los sitios de fosforilación para la caseína quinasa II (subrayado simple) y para la proteína quinasa C (subrayado ancho).

Tabla 16.- Putativos elementos reguladores dentro del promotor de *CsTCTP* mediante búsqueda en la base de datos PlantCARE

Elemento	Secuencia	Posición	Función esperada
ARE	TGGTTT	104(-)	Elemento regulador esencial para la inducción anaeróbica
CAAT-box	CAAT	13(+)	Elemento común en regiones promotoras y potenciadoras
	CAAAT	19(+)	
	CAATT	67(+)	
	CAATT	85(+)	
F-box	CTATTCTCATT	67(+)	
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	59(+)	Elemento implicado en defensa y respuesta a estrés

Se indica la orientación de los elementos (+ sentido; - anti-sentido)

Para identificar los elementos reguladores conservados en plantas, la secuencia promotora de *CsTCTP* se analizó usando la base de datos PlantCARE, ya que esos elementos están implicados en la regulación de la transcripción de muchos genes que juegan papeles funcionales importantes en varios procesos biológicos, como respuesta a estreses abióticos y procesos de

desarrollo. En la Tabla 16 se muestran algunos putativos elementos conservados encontrados en el extremo 5'UTR de *CsTCTP*, entre ellos, aquellos relacionados con la respuesta a estrés y defensa.

7.2.2 Análisis filogenético

Para llevar a cabo el análisis filogenético de las secuencias identificadas, se compararon dichas secuencias mediante BLAST con otras disponibles en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los análisis a nivel de nucleótido revelaron que las secuencias *CsTCTP*, *QsTCTP* y *QrTCTP* guardan una homología de entre el 89% con la secuencia *TCTP* de *H. brasiliensis* (JN200814) y el 78% con la de *Brachypodium distachyon* (XM_003577218). La secuencia de aminoácidos deducida de los tres genes se analizó mediante similitud con la base de datos de proteínas no redundantes GenBank usando el algoritmo BLASTX. La máxima identidad (95%) se detectó con TCTP de *Vigna angularis*, mientras que la mínima se detectó con TCTP de *Plasmodium falciparum* (32%).

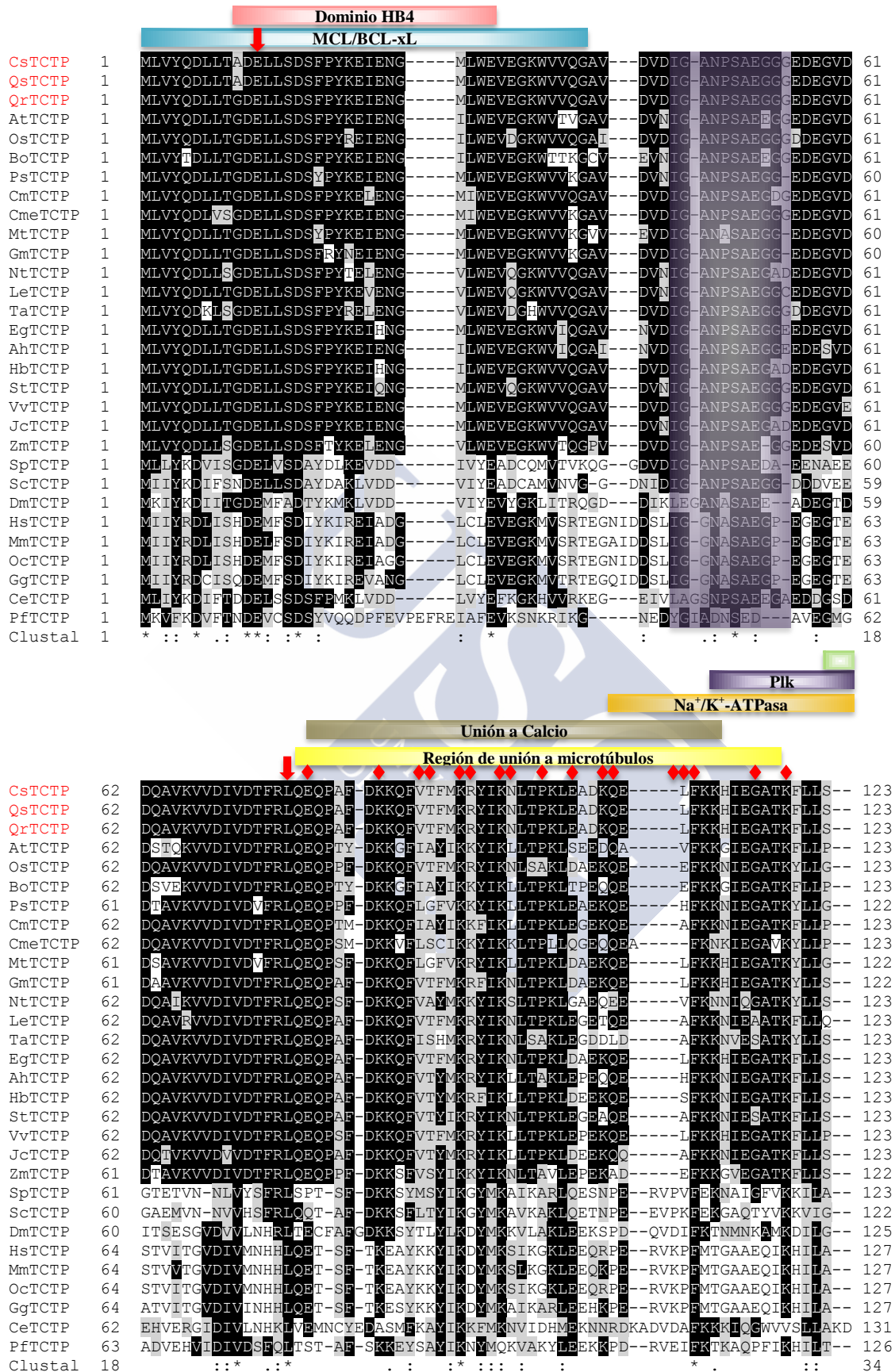
En la Tabla 17 se muestran los valores de identidad de las proteínas CsTCTP y QrTCTP con proteínas TCTP de otras especies. La homología con otras secuencias de plantas varía entre el 95% y el 77%, mientras que en el caso de secuencias proteicas no vegetales los porcentajes oscilan entre un 41% y un 32%.

Tabla 17.- Proteínas homólogas a CsTCTP y QrTCTP de acuerdo con el análisis BLAST

Número de acceso	Organismo	Identidad (%)	Número de aa
KOM35515	<i>V. angularis</i>	95	168
Q5J907	<i>E. guineensis</i>	94	168
XP_002283842	<i>V. vinifera</i>	94	168
Q9ZSW9	<i>H. brasiliensis</i>	93	168
KYP74309	<i>Cajanus cajan</i>	93	168
XP_015875041	<i>Ziziphusjuzuba</i>	93	168
XP_008789873	<i>P. dactylifera</i>	92	168
XP_012434173	<i>Gossypiumraimondii</i>	92	168
XP_004495707	<i>Cicerarietinum</i>	92	168
ABO25950	<i>J. curcas</i>	92	168
ABI84255	<i>Arachis hypogaea</i>	91	168
KEH37249	<i>M. truncatula</i>	91	167
BAT15135	<i>O. sativa</i>	88	168
KRH12062	<i>G. max</i>	88	167
NP_001234566	<i>Lycopersicon esculentum</i>	87	168
AKG62084	<i>N. tabacum</i>	86	168
AAF40198	<i>C. melo</i>	86	168
ABB87118	<i>S. tuberosum</i>	86	168
ABQ18237	<i>T. aestivum</i>	83	168

AAB19090	<i>P. sativum</i>	82	167
ABC02401	<i>C. maxima</i>	82	168
AFW69740	<i>Z. mays</i>	79	167
AEE75847	<i>A. thaliana</i>	79	168
AAL13303	<i>B. oleracea</i>	77	168
NP_033455	<i>Mus musculus</i>	41	172
NP_594328	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	36	168
NP_012867	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39	167
Q9VGS2	<i>D. melanogaster</i>	39	172
CUK27657	<i>Homo sapiens</i>	39	172
AAA67296	<i>Gallus gallus</i>	37	172
P43348	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	37	172
CAB02099	<i>C. elegans</i>	34	181
XP_001351667	<i>Plasmodium falciparum</i>	32	171

En la Figura 58 se muestra el alineamiento entre las secuencias CsTCTP, QsTCTP y QrTCTP y las citadas en la Tabla 17, confirmando el elevado grado de homología que presentan las proteínas TCTP vegetales. Como era esperable, el grado de similitud disminuyó considerablemente con respecto a las proteínas TCTP no vegetales, aunque estas últimas también presentan elevada homología entre ellas. En este alineamiento se muestran dominios funcionales para la interacción con otras proteínas identificados en varias TCTPs no vegetales como con la quinasa Plk de control del ciclo celular (Yarm, 2002), con la proteína antiapoptótica MCL/BCL (Yang *et al.*, 2005) y con la Na⁺/K⁺-ATPasa (Jung *et al.*, 2004), así como el dominio de unión a calcio y el dominio de auto-interacción de TCTP (Kim *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2000). También se ha localizado un dominio HB4 potencialmente relacionado con la actividad antiapoptótica (Trisciuglio *et al.*, 2013) y la región de unión a microtúbulos con los sitios de unión a tubulina (Gachet *et al.*, 1999). Además se identificó en las TCTP de Fagáceas la triada de aminoácidos Glu (E) 12, Leu (L) 76 y Glu (E) 134, caracterizada como una superficie de interacción para la unión de Rab GTPasas en la familia de proteínas MSS4/DSS4 relacionada estructuralmente (Thaw *et al.*, 2001), junto con los aminoácidos circundantes (Figura 58).



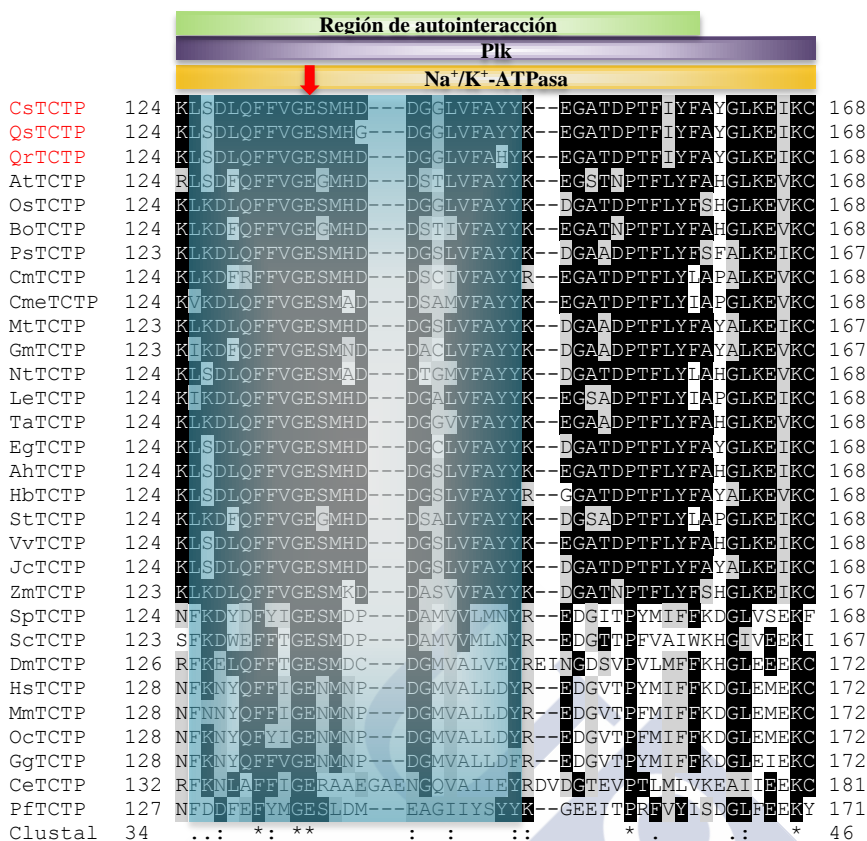


Figura 58.- Alineamiento realizado con el programa ClustalX 2.1 de las secuencias de aminoácidos de CsTCTP y QrTCTP con secuencias homólogas vegetales y no vegetales extraídas de la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mediante BLAST. Las posiciones con aminoácidos idénticos están enmarcadas en negro y los bloques de residuos similares en gris. Las flechas indican los residuos de la triada de unión de Rab GTPasa (Thaw *et al.*, 2001). Las secuencias características TCTP1 y TCTP2 están enmarcadas en violeta y azul respectivamente. Se indican los dominios identificados en TCTPs no vegetales: interacción MCL/BCL-xL, unión a Ca²⁺, dominio HB4, región de auto-interacción de TCTP, región de unión a microtúbulos con los sitios de unión a tubulina (rombos), interacción Plk e interacción Na⁺/K⁺-ATPasa. Los números de acceso de las especies usadas en el análisis son: At3g16640 (TAIR At3g16640, *A. thaliana*); Os11g43900 (MIPS Os11g43900, *O. sativa*); PsTCTP (GenBank P50906, *P. sativum*); CmTCTP (GenBank ABC02401, *Curcubita maxima*); MtTCTP1 (TIGR TC106535, *M. trunculata*); GmTCTP1 (GenBank TC214072, *G. maximum*); NtTCTP (TIGR TC924, *N. tabbacum*); LtTCTP1 (TIGR TC161910, *L. esculentum*); TaTCTP2 (TIGR TC249618, *Triticum aestivum*); ZmTCTP1 (TIGR TC286428, *Z. mays*); SpTCTP (GenBank Q10344, *Schizosaccharomyces pombe*); ScTCTP (GenBank P35691, *Saccharomyces cerevisiae*); DmTCTP (GenBank Q9VGS2, *D. melanogaster*); HsTCTP (GenBank CAB87812c, *Homo sapiens*); CeTCTP (GenBank PQ93573, *C. elegans*); PfTCTP (GenBank Q813Z5, *Plasmodium falciparum*).

Para revelar las relaciones evolutivas entre las dos TCTPs de Fagáceas identificadas en este trabajo y otras proteínas TCTP de varias especies vegetales y animales, se generó un árbol filogenético a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de CsTCTP, QsTCTP y QrTCTP y de los homólogos TCTP citados en la Tabla 17. El análisis filogenético se realizó usando el método Neighbor Joining con el programa MEGA 7. Como se muestra en la Figura 59, CsTCTP y QrTCTP están relacionadas más próximamente con TCTP de *E. guineensis* así como con las TCTPs de *Arachis hypogaea* y *V. vinifera*. Ambas proteínas guardan una estrecha relación entre ellas y con las TCTPs vegetales, no mostrando diferencias entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. Por otra parte, están más distantes filogenéticamente

de las de animales y levaduras, ya que las secuencias de plantas se agrupan en un único clado, al igual que las correspondientes a hongos y a animales.

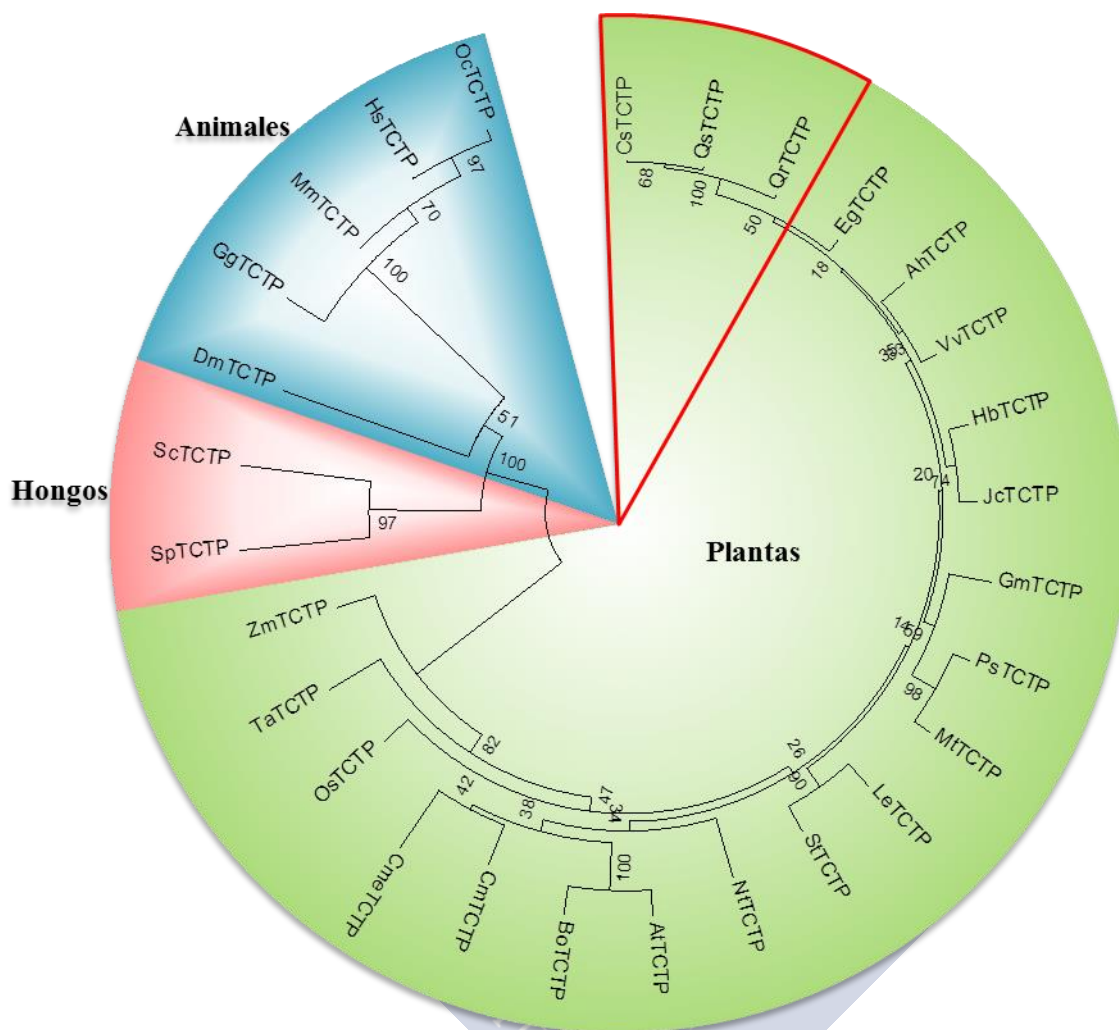


Figura 59.- Comparación de secuencia de CsTCTP y QrTCTP con otras proteínas TCTP de plantas y no vegetales. Las secuencias predichas de las proteínas TCTP se alinearon mediante Clustal W usando una matriz BLOSUM. El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 7 usando el algoritmo Neighbor-joining. El porcentaje de réplicas en la prueba de bootstrap (1000 réplicas) se muestra en las ramas. Las distancias evolutivas fueron inferidas usando el modelo de sustitución de Poisson. AtTCTP (*A. thaliana*); CmTCTP (*Curcubita maxima*); CsTCTP (*C. sativa*); DmTCTP (*Drosophila melanogaster*); GmTCTP1 (*Glycine maximum*); HsTCTP (*Homo sapiens*); LeTCTP1 (*Lycopersicon esculentum*); MtTCTP1 (*Medicago trunculata*); NtTCTP (*Nicotiana tabbacum*); OsTCTP (*O. sativa*); PsTCTP (*P. sativum*); QrTCTP (*Q. robur*); QsTCTP (*Q. suber*); ScTCTP (*Saccharomyces cerevisiae*); SpTCTP (*Schizosaccharomyces pombe*); TaTCTP2 (*Triticum aestivum*); ZmTCTP1 (*Z. mays*).

7.2.3 Modelado estructural

La estructura secundaria de CsTCTP se predijo con el programa Stride (Frishman& Argos, 1995) mostrando un alto grado de similitud con la proteína de *Saccharomyces pombe* consistiendo en la misma serie de láminas- β y hélices- α en posiciones ortólogas (Thaw *et al.*, 2001).

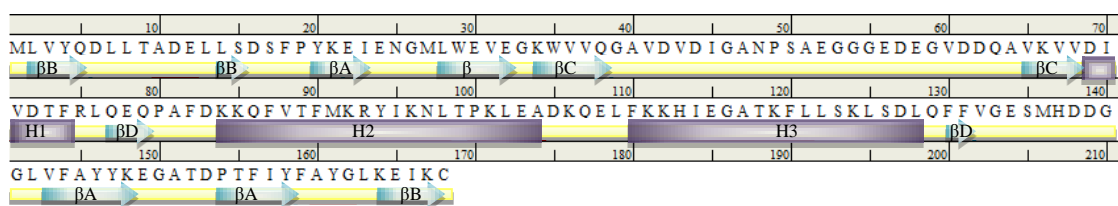


Figura 60.- Estructura secundaria de CsTCTP. Las hélices y láminas- β están representadas por rectángulos y flechas respectivamente.

Para investigar la posibilidad de que las proteínas CsTCTP, QsTCTP y QrTCTP tuvieran funciones similares a las TCTPs de otros organismos, se realizó un modelado por homología para obtener la predicción de la estructura para las proteínas TCTPs de Fagáceas (Figura 61). Se usó como molde la estructura conocida de TCTP de *C. elegans* (ID. PDB: 2LOY.1). Las estructuras generadas contenían los dominios α -hélice y lámina- β en posiciones ortólogas a lo observado en otras especies (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). La lámina- β B de tres hebras y la pequeña α -hélice 1 se empaquetaron contra una cara de la lámina- β A que consta de cuatro hebras (Figura 61). La hélice H3 se empaquetó contra una parte de la cara opuesta de la lámina- β A, dejando el resto de la cara en gran parte hidrófila expuesta al disolvente. La hélice H2 se empaquetó contra la hélice H3 (formando una horquilla α -helicoidal), los bucles β -sándwich A-B, y la región irregular Ser135-Val142. Otra característica estructural es la lámina- β C de dos hebras, que sobresale de la estructura núcleo globular formado por el resto de la proteína. El empaquetamiento de elementos estructurales contra las dos caras de la lámina A generó dos núcleos hidrofóbicos. Los aminoácidos que están conservados en todas las TCTP, junto con la hélice H1 están agrupados en torno a la superficie de interacción GTPasa. El dominio donde se encuentran los residuos conservados Glu12, Leu76 y Glu134 mostró la misma configuración espacial a la observada en otras especies. La familia TCTP tiene dos regiones primarias de elevada homología de secuencia denominadas TCTP1 y TCTP2. La región TCTP1, predominantemente hidrofílica, se localiza en el bucle flexible en los modelos. La región TCTP2 se localiza en un bucle, bien estructurado pero irregular y las dos hebras de la lámina β que la flanquean. El bucle TCTP1 está conectado con la estructura núcleo globular mediante la lámina β C, la cual experimentalmente es la parte más pobremente definida de la estructura globular debido a su posición expuesta (Figura 61).

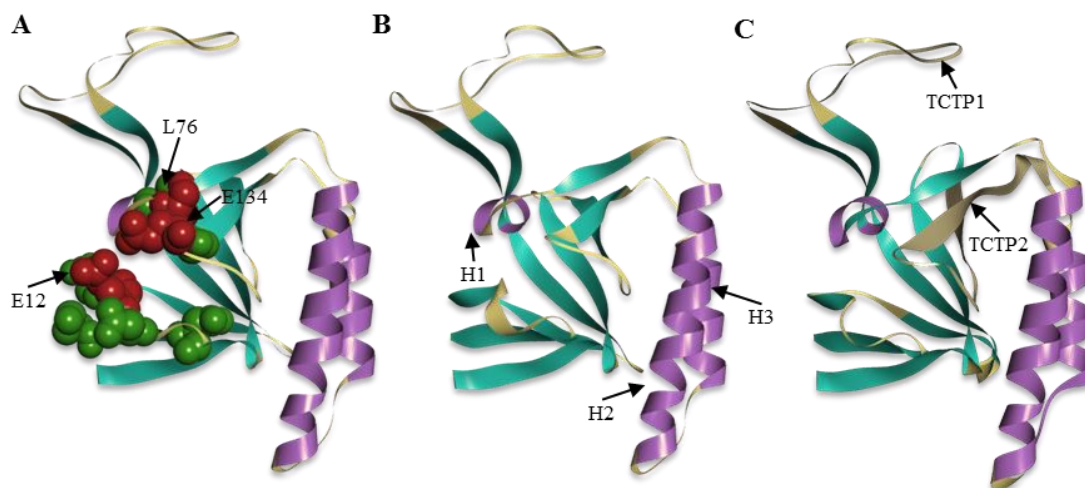


Figura 61.- Modelado estructural de CsTCTP (A), QrTCTP (B) y QsTCTP (C) obtenido usando como molde la estructura conocida de TCTP de *C. elegans* (ID. PDB: 2LOY.1) con el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>; Guex y Peitsch, 1997). La mayoría de los residuos completamente conservados en todas las secuencias de TCTP, como se identificaron en el alineamiento, están agrupados alrededor de la superficie de interacción de Rab GTPasa y en la estructura se representan como esferas. Estos residuos están coloreados en verde (Met-1, Asp-6, Asp-11, Asp-16, Val-71 y Gly 133) y los de la tríada de unión en rojo (Glu-12, Leu76 y Glu134) (A). Se localizan también las hélices H1, H2 y H3 (B) y las secuencias características TCTP1 y TCTP2 (C). Las α -hélices y láminas- β de las estructuras están representadas en lila y azul respectivamente.

7.2.4 Análisis de la expresión del gen *TCTP* durante la embriogénesis

Para determinar la posible implicación del gen *TCTP* en la embriogénesis de Fagáceas hemos procedido al análisis de expresión durante el desarrollo de embriones zigóticos de castaño, así como en embriones somáticos de castaño y alcornoque mantenidos en proliferación mediante embriogénesis secundaria. A partir de estas líneas embriogénicas se aislaron embriones en diferentes estadios de desarrollo: globular, torpedo y cotiledonar.

7.2.4.1 Expresión del gen *TCTP* en embriones zigóticos de castaño

En los embriones zigóticos en estado globular se detectó una expresión basal en el embrión, pero con una mayor acumulación del transcrito en la protodermis, así como en uno de los polos del embrión (Figura 62A). Además, en el tejido materno el transcrito se localizó en el endospermo y el endotelio (Figura 62 A y C). A medida que progresa el desarrollo del embrión la expresión se mantiene en la protodermis (Figura 62 C y D), detectándose expresión en el procambium de los ejes embrionarios (Figura 62D). El análisis llevado a cabo en el ápice de la raíz primaria de embriones zigóticos germinados *in vitro*, mostró moderada expresión del gen el MR y en la caliptra, con una abundante expresión en las células que se desprenden de ella (Figura 62 E y G). Cabe señalar que la expresión en el MAR parece ser más abundante en algunas células con tipos celulares en división a partir de los cuales se originan las capas celulares de la raíz (Figura 62 E y G).

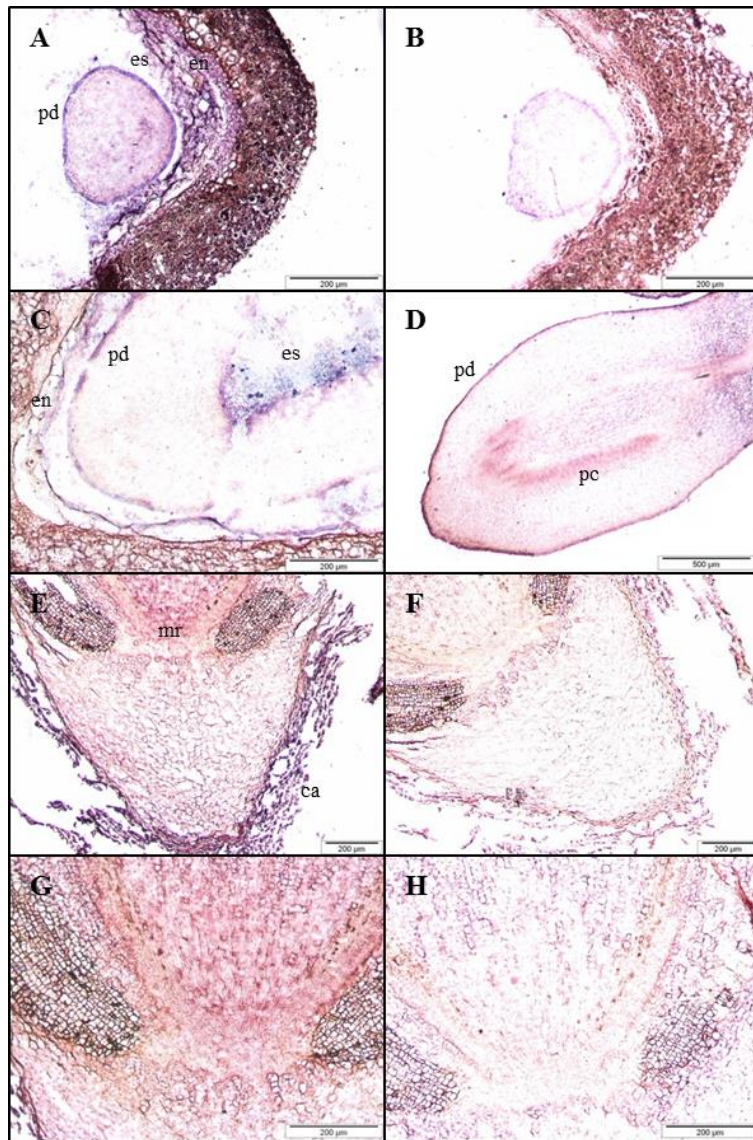


Figura 62.- Localización *in situ* de la expresión de *TCTP* en secciones longitudinales de embriones zigóticos de castaño en estadio globular (A y B), cotiledonar (C), eje embrionario aislado de una semilla inmadura (D) y raíz primaria de una semilla de castaño germinada *in vitro* (E, F, G y H) hibridadas con la sonda específica antisentido (A, C, D, E y G) y sentido (B, F y H). en (endotelio): es (endospermo); mr (meristemo radicular); ca (caliptra); pc (procambium); pd (protodermis).

7.2.4.2 Expresión del gen *TCTP* durante la proliferación de embriones somáticos mediante embriogénesis secundaria

Para estudiar el posible papel del gen *TCTP* durante el desarrollo de los embriones somáticos hemos evaluado su expresión mediante qPCR e hibridación *in situ* en embriones en diferentes estados de desarrollo.

7.2.4.2.1 Análisis de la expresión del gen *TCTP* en embriones somáticos de castaño y alcornoque mediante qPCR

La expresión relativa del gen *TCTP* se llevó a cabo en embriones en estadios de desarrollo globular, torpedo y cotiledonar aislados de los cultivos en proliferación de dos líneas embriogénicas de castaño (CI-3 y HV) y una de alcornoque (Qs3).

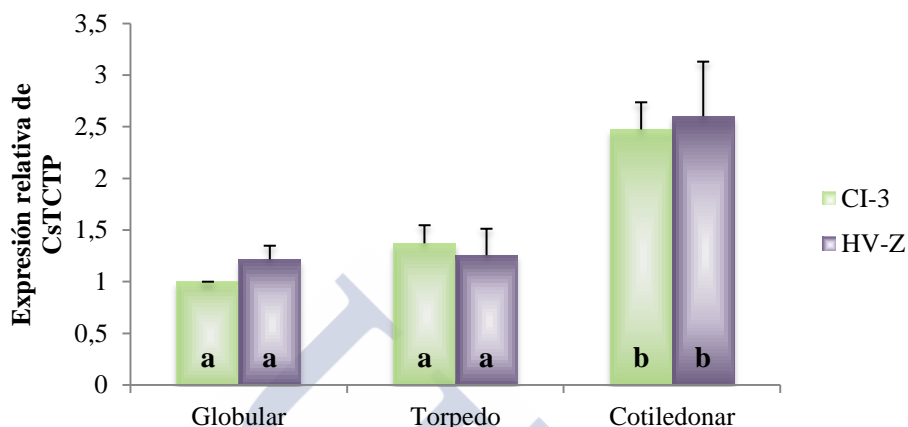


Figura 63.- Análisis mediante qPCR de la expresión del gen *CsTCTP* en embriones somáticos de castaño procedentes de dos genotipos (CI-3 y HV-Z) en distintos estados de desarrollo (globular, torpedo y cotiledonar). La expresión de los genes de referencia Actina, Ubiquitina y Factor de elongación se usó como control interno para normalizar los datos de expresión. Los resultados se expresan como valores relativos a la muestra con menor nivel de expresión y corresponden a la media de tres replicados biológicos \pm error estándar. Las barras indican el error estándar. Las diferentes letras representan diferencias significativas dentro de cada genotipo durante el desarrollo de los embriones ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de Duncan.

El análisis mostró que la expresión del gen *TCTP* aumenta en los dos genotipos de castaño a medida que avanza el estado de desarrollo de los embriones, mostrando en las dos líneas diferencias significativas en embriones cotiledonares con respecto a los embriones en estadios globulares y torpedos (Figura 63).

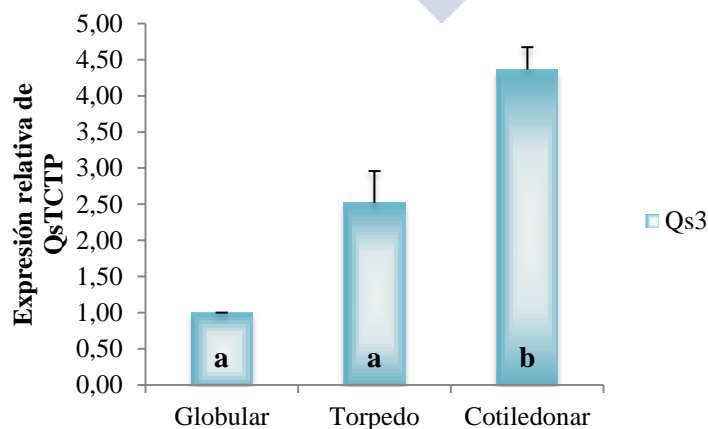


Figura 64.- Análisis mediante qPCR de la expresión del gen *TCTP* en embriones somáticos de alcornoque en distintos estados de desarrollo (globular, torpedo y cotiledonar). La expresión de los genes de referencia Actina, Ubiquitina y

Factor de elongación se usó como control interno para normalizar los datos de expresión. Los resultados se expresan como valores relativos a la muestra con menor nivel de expresión (globular) y corresponden a la media de tres replicados biológicos \pm error estándar. Las barras indican el error estándar. Las diferentes letras representan diferencias significativas durante el desarrollo de los embriones. Los datos fueron analizados usando ANOVA seguido de test Tukey.

El análisis de la expresión relativa del gen *TCTP* en embriones somáticos de alcornoque mostró dos grupos homogéneos, uno formado por los embriones en estadios globular y torpedo y otro con los embriones en estadio cotiledonar. De forma similar a lo descrito previamente en los embriones de castaño, la expresión aumenta significativamente en los embriones en fase cotiledonar (Figura 64).

7.2.4.2.2 *Análisis de la expresión de TCTP durante el desarrollo de embriones somáticos mediante hibridación in situ*

Para determinar si las diferencias observadas a nivel de expresión pueden estar asociadas a células o tejidos específicos, se analizó el patrón de expresión espacial del gen mediante hibridación *in situ* en los embriones somáticos en diferentes estados de histodiferenciación.

7.2.4.2.2.1 *Castaño*

En los embriones somáticos de castaño en estadios tempranos (globular y oblongo), el gen se expresa de forma generalizada en todo el embrión con mayor acumulación en la protodermis (Figura 65 A y C). A medida que avanza en su desarrollo, la expresión se mantiene en la protodermis, en la capa más externa del MA y en polo radicular (Figura 65 E y H). En el MR el transcrito se localiza en las capas más externas (Figura 65 H).

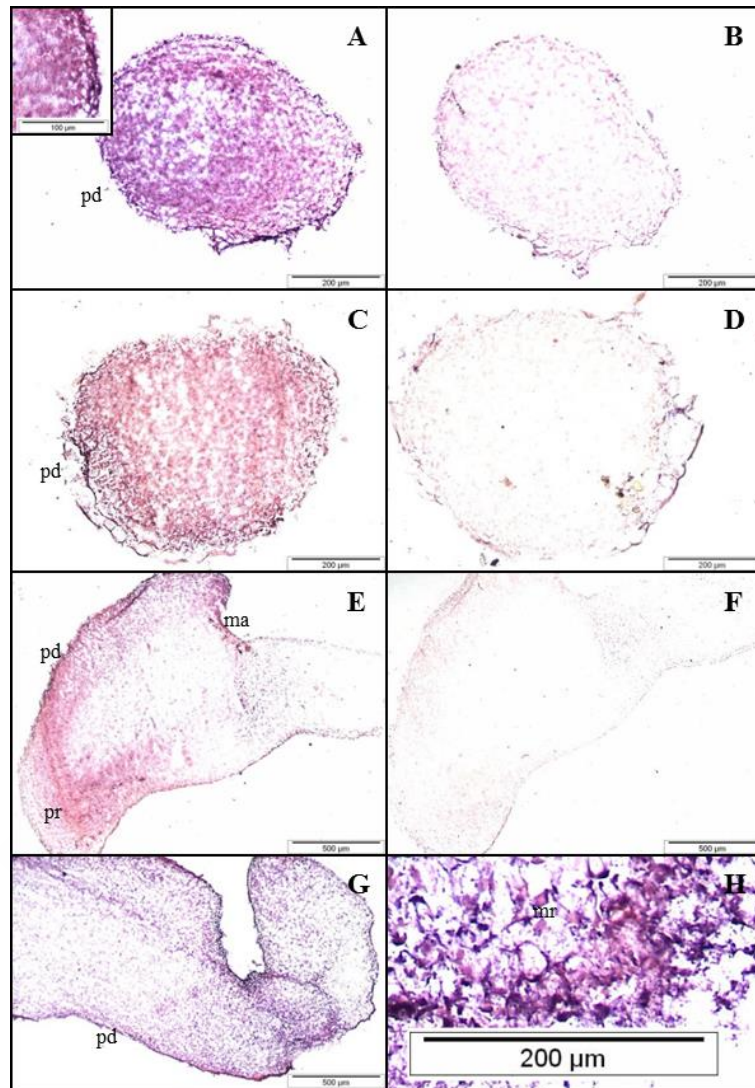


Figura 65.- Localización *in situ* del ARNm *TCTP* en secciones de embriones somáticos de castaño en estadio globular (A, B, C y D) y cotiledonar (E, F, G y H) hibridadas con la sonda específica antisentido (A, C, E, G y H) y sentido (B, D y F). En la sección A se muestra detalle de la protodermis y la sección H es un aumento del MR del embrión de la sección G. ma (meristemo caulinar); pd (protodermis); pr (polo radicular).

7.2.4.2.2 Alcornoque

En los embriones somáticos de alcornoque el patrón de expresión del gen *TCTP* es similar a lo observado en castaño, localizándose de manera uniforme en embriones en estadio globular, mostrando también una mayor acumulación del transcrito en la protodermis (Figura 66 A y D), que se mantiene en estadios posteriores (Figura 66 C, F, I y J), a partir de la cual se originan nuevos embriones secundarios (Figura 66 C e I). En el embrión globular temprano, originado por embriogénesis secundaria que se muestra en la Figura 66 D, la señal de hibridación es más intensa que en embriones globulares más avanzados y con una acumulación mayor del transcrito en el polo basal, que en base al patrón de capas celulares observado dará lugar al polo radicular. En estados de desarrollo posteriores, el transcrito se localiza preferentemente en las capas del MA y en la zona axilar de los cotiledones (Figura 66 C, F, G y K). En estos embriones también

se observa señal de hibridación en el procambium (Figura 66 C, F, I y J). En la zona basal de los embriones cotiledonares se observa una fuerte expresión del gen, que corresponde con el dominio del MR y caliptra/columela (Figura 66 C y F), especialmente en los embriones cotiledonares en un estado avanzado de desarrollo (Figura 66 I y J). Cabe señalar la expresión detectada en zonas en división activa en los meristemos apicales de los embriones cotiledonares, que pueden corresponder a nuevas estructuras proembriónicas (Figura 66 C y K, flechas).

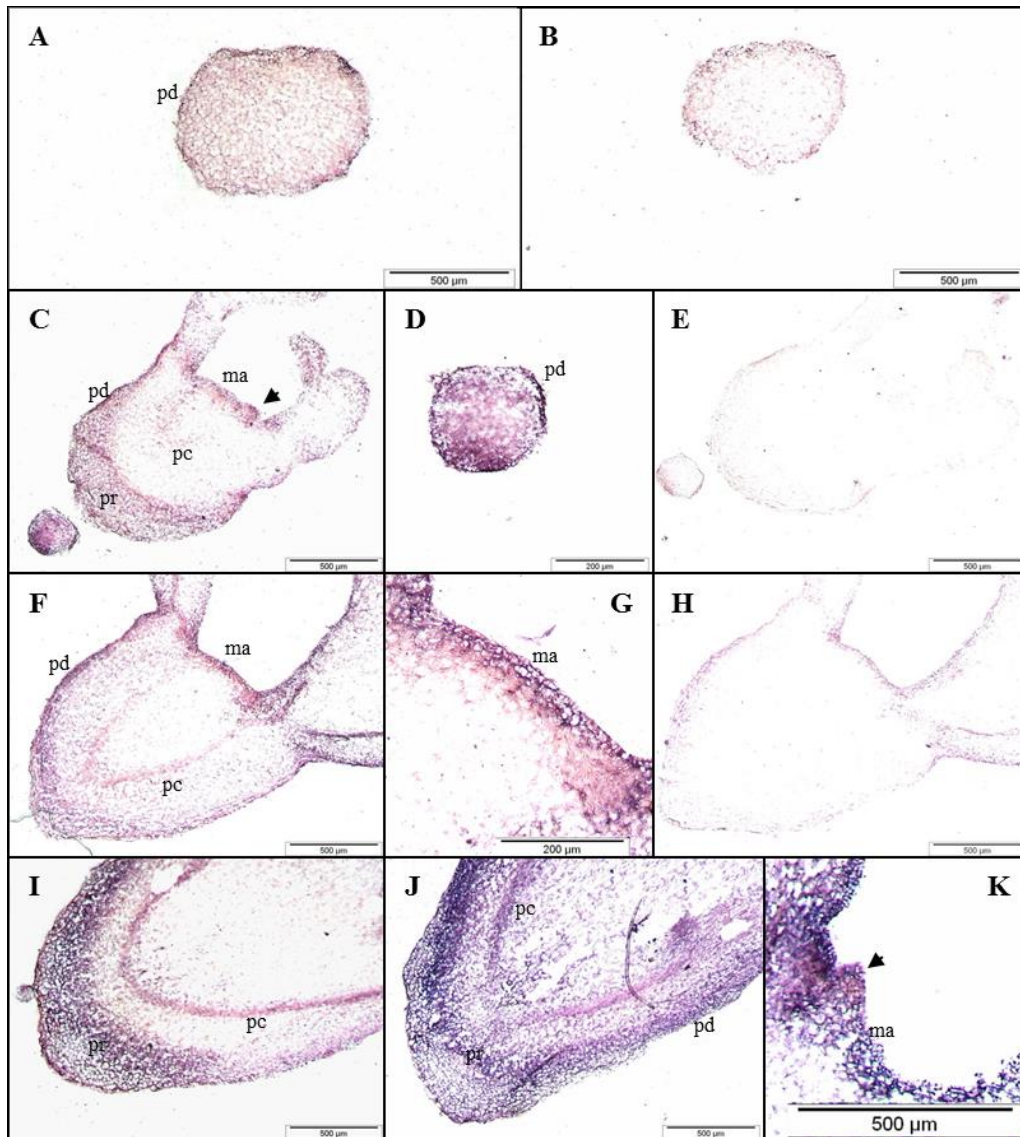


Figura 66.- Localización *in situ* del transcrito *TCTP* en secciones de embriones somáticos de *Q. suber* en estadio globular (A y B), torpedo (C y E) y cotiledonar (F, H, I y J) hibridadas con la sonda específica antisentido (A, C, D, F, G, I, J y K) y sentido (B, E y H). En la imagen D se muestra una ampliación de un embrión globular temprano originado por embriogénesis secundaria en la zona del hipocótilo del embrión torpedo C. En las imágenes G y K se muestran ampliaciones del MA de los embriones F y J respectivamente. ma (meristemo apical); pc (procambium); pd (protodermis); pr (polo radicular).

7.2.5 Análisis de la expresión del gen *TCTP* en tejidos post embrionarios mediante hibridación *in situ*.

Para completar el estudio, se llevó a cabo la localización de la expresión del gen *TCTP* en ápices de brotes *in vitro* de castaño y alcornoque y en la parte apical de brotes obtenidos mediante germinación de los embriones somáticos de alcornoque y de plántulas de campo de castaño. También se estudió el patrón de expresión del gen en primordios de RAs inducidos con auxina en brotes de castaño y durante el desarrollo de la raíz de plántulas de alcornoque.

7.2.5.1 Expresión del gen *TCTP* en brotes de castaño y alcornoque

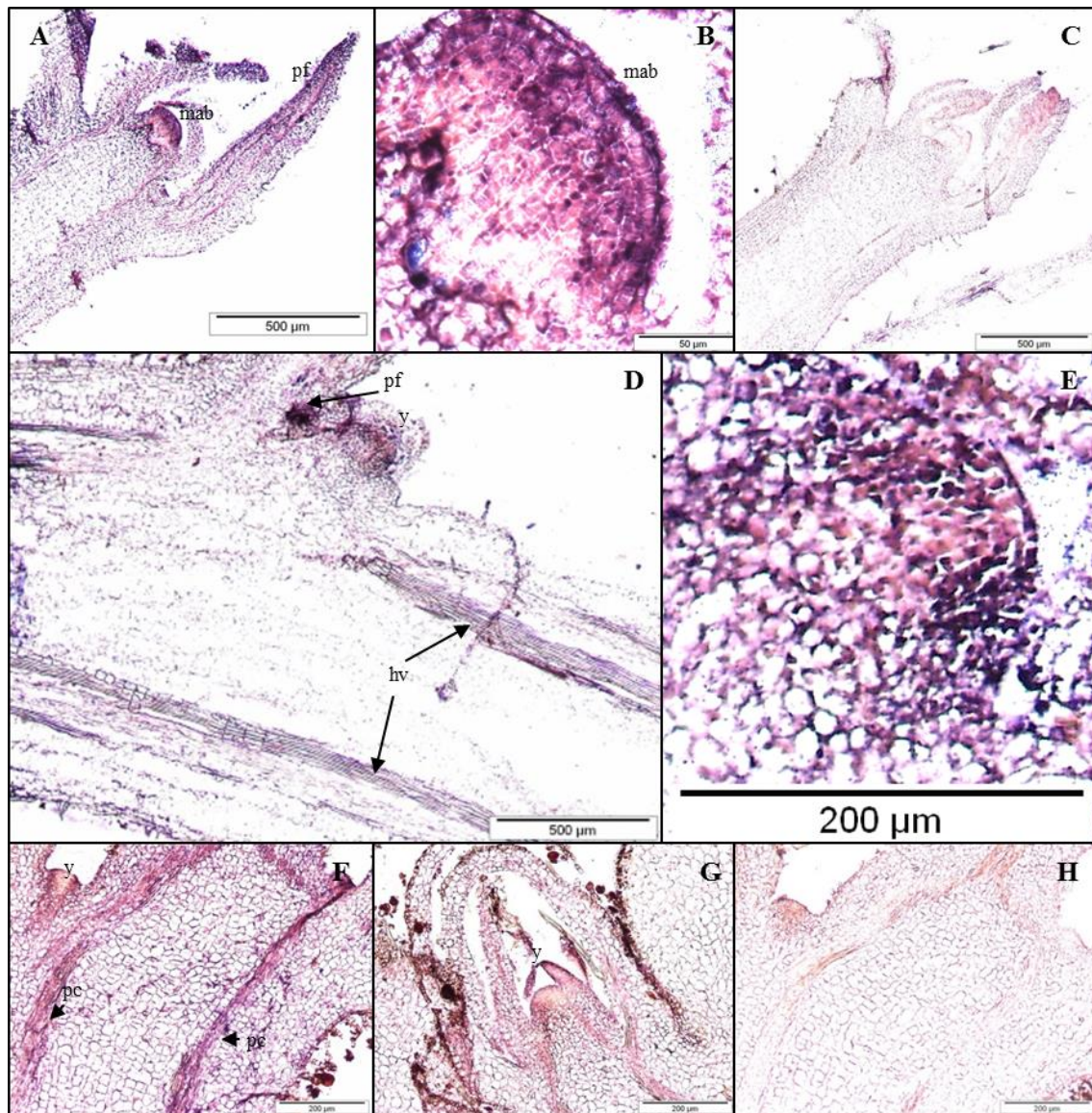


Figura 67.- Localización *in situ* de la expresión de *TCTP* en brotes de castaño hibridados con la sonda específica antisense (A, B, D, E, F y G) y sentido (C y H). Se muestran secciones longitudinales de brotes de plántulas en multiplicación (A, B, C, D y E) y de ápices de plántulas de campo (F, G y H). En la imagen B se muestra detalle del MAB de la sección A y en la imagen D se muestra una yema axilar de la zona basal del brote con un aumento de la misma en E. hv (haces vasculares); mab (meristemo apical del brote); pc (procambium); pf (primordio foliar); y (yema axilar).

El análisis de la expresión del gen *TCTP* brotes mostró una localización del transcrito en las capas L1, L2 y L3 del MAB, tanto en la zona central como en la zona periférica del mismo, donde se inician los órganos laterales (Figura 67 A y B; Figura 68 A, B y E). El transcrito también se localizó en tejidos con una elevada actividad mitótica como en las células en crecimiento activo de los primordios foliares (Figura 67 A y B; Figura 68 A, B y E) y en el procambium (Figura 67 A y F; Figura 68 A, B, E y G). En yemas axilares, *TCTP* mantiene el mismo patrón de expresión que en el MAB, con localización en la zona central y periférica (Figura 67 D y G; Figura 68 C, D y G). Se observa también una asociación de *TCTP* a los haces vasculares de la parte basal del brote (Figura 67 D).

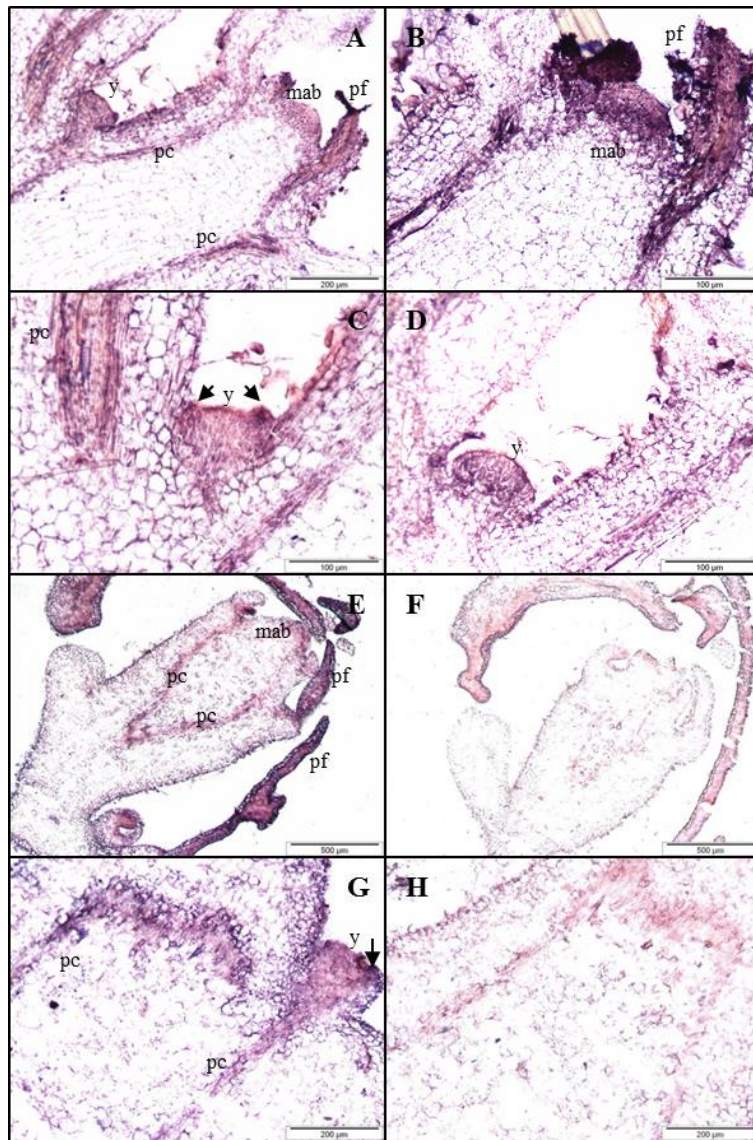


Figura 68.- Localización *in situ* del ARNm *TCTP* en secciones longitudinales de ápice de brote de alcornoque procedente de un embrión somático germinado (A y B) y de ápice de brote multiplicado *in vitro* (C, D, E y F) hibridadas con la sonda específica antisentido (A, B, C y E) y sentido (D y F). En la imagen B se muestra en detalle la yema de la sección A y la flechas indican los primordios foliares incipientes en las yemas. mab (meristemo apical del brote); pc (procambium); pf (primordio foliar); y (yema).

7.2.5.2 Expresión del gen *TCTP* en raíces

Por una parte se analizó la expresión del gen, en etapas tempranas del desarrollo de RAs en castaño, cuando ya se inició el primordio radicular, tras 10 días del proceso de inducción con auxina (Figura 69). Además, se analizó la expresión de *TCTP* en la zona apical de RA desarrollada en brotes de alcornoque, en este caso de forma espontánea, sin tratamiento con auxina (Figura 70). En ambos casos, se detectó una señal intensa tanto en el primordio radicular emergente (Figura 69 A, B), como en el ápice radicular de la raíz de alcornoque (Figura 70 A, B, C, D). En el caso de castaño, donde se muestra la sección de tallo con el primordio emergente, la señal está estrictamente ligada a la raíz en desarrollo, con señal intensa en las células más distales del meristemo que dan origen a la columela/caliptra, no detectándose acumulación del mensajero en otros tejidos del tallo. En el caso de la raíz de alcornoque, el patrón de expresión es similar al observado en castaño, localizándose el transcrito en el MAR y en las primeras capas celulares de la columela, así como también en las células que se desprenden de la caliptra (Figura 70 A, B, C, D). No se detectó señal de hibridación en las secciones hibridadas con la sonda sentido (Figura 69 C y D; Figura 70 E).

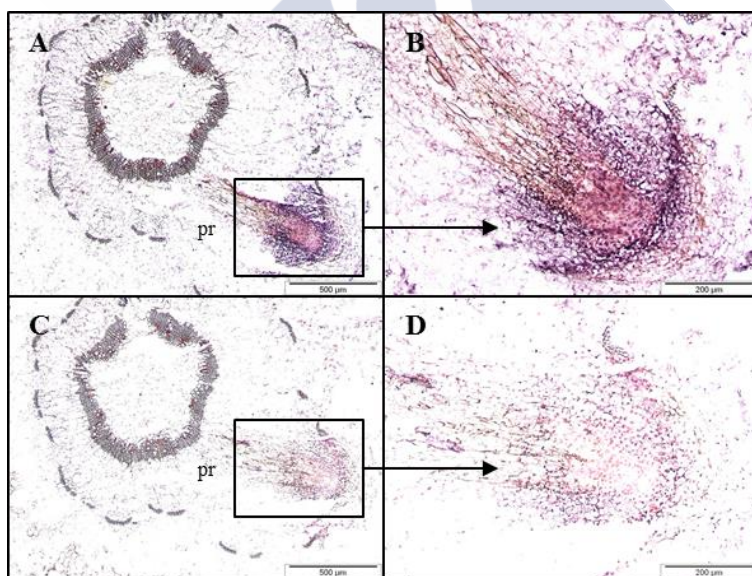


Figura 69.- Localización de la expresión de *TCTP* en secciones transversales de la base de un brote de castaño tratado con AIB 1 mg.L⁻¹ durante 1 min. y recogido a los 10 días después del tratamiento, hibridadas con la sonda específica antisentido (A y B) y sentido (C y D). En las imágenes B y D se muestran detalles del primordio de la RA de las secciones A y B respectivamente. pr: primordio radicular.

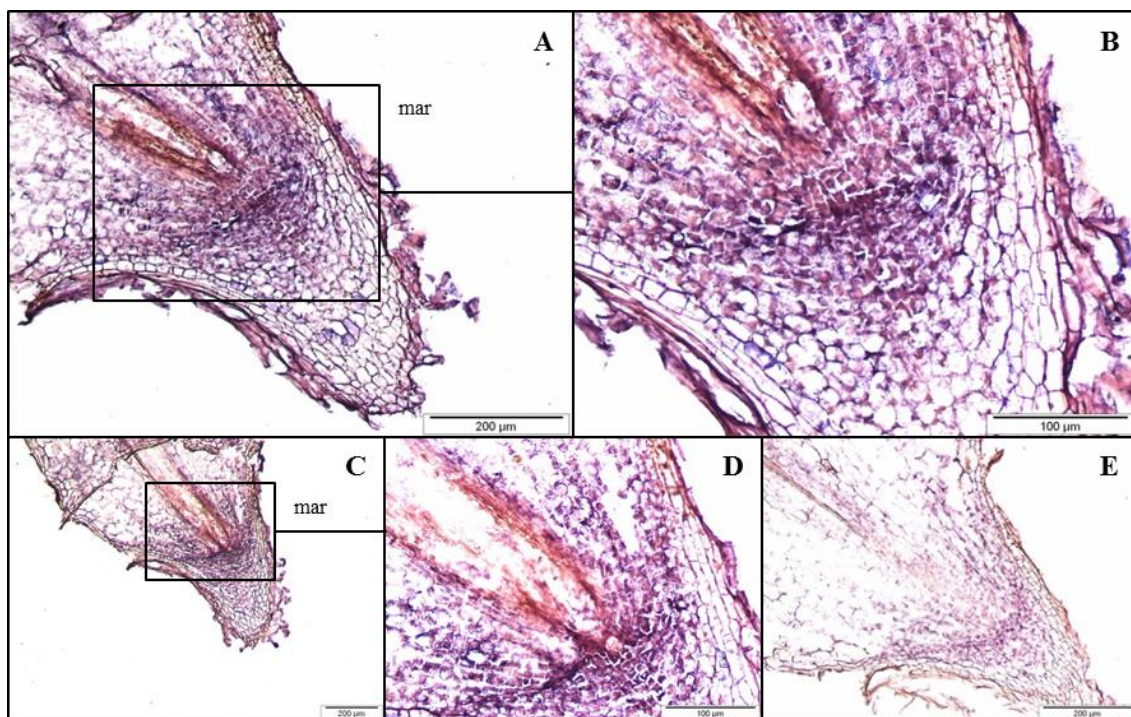


Figura 70.- Localización *in situ* del transcrito TCTP en secciones longitudinales del ápice de una raíz desarrollada en un brote de *Q. suber* hibridadas con la sonda específica antisentido (A, B, C y D) y sentido (E). En las imágenes B y D se muestran detalles de los meristemas radiculares de las secciones A y C respectivamente. mar (meristemo apical de la raíz).

7.3 Discusión

El estudio de TCTP se ha llevado a cabo principalmente en animales, mientras que en plantas solo se han llevado a cabo en unos pocos sistemas experimentales, mayoritariamente en *Arabidopsis*. Dadas las distintas funciones de genes de la familia TCTP asociadas a proliferación y división celular, así como reprogramación fenotípica (Amson, Karp, *et al.*, 2013), y dado que en vegetales, en poca especies se ha explorado su posible función en procesos morfogénéticos y/o de regeneración, en este trabajo hemos aislado y caracterizado tres secuencias TCTP nombradas *CsTCTP*, *QsTCTP* y *QrTCTP* en tres especies leñosas Fagáceas. Tanto las secuencias nucleotídicas aisladas en este trabajo, como las secuencias aminoacídicas deducidas de dichas secuencias, mostraron alta homología con las de otros organismos vegetales. Además, la presencia de los dos dominios característicos, TCTP1 y TCTP2, en las tres proteínas putativas y de dos sitios de miristoilación que se superponen con estas, confirma que forman parte de la familia TCTP. La topología N-terminal del sitio de miristoilación que implica a la secuencia TCTP1 puede indicar una posible región para interacciones proteína-proteína o asociación a membrana, y de hecho la secuencia TCTP2 está implicada en interacciones proteína-proteína (Ermolayev *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004). La posibilidad de interactuar con otras proteínas, es de gran relevancia para sus funciones biológicas (Bommer

y Thiele, 2004; Bommer, 2012). Las proteínas TCTP analizadas en este trabajo podrían, por lo tanto, participar en interacciones con otras proteínas en varios procesos biológicos. Sin embargo, no parecen ser proteínas de membrana ya que los análisis *in silico* no revelaron la presencia de ningún dominio transmembrana. Las secuencias aminoacídicas contienen sitios putativos de fosforilación, lo que indica una posible regulación por quinasas, presentando también la región de unión a calcio y a microtúbulos (Gachet *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Nakkaew *et al.*, 2010), como sus homólogas en otras especies, por lo que podrían ejercer funciones similares tales como controlar el ciclo celular siendo moduladas por calcio, al igual que TCTP de *E. guineensis*, con la que presentan una elevada homología (Nakkaew *et al.*, 2010). La región promotora en el extremo 5' de *CsTCTP* contiene varios elementos relacionados con el estrés abiótico y biótico, concordantes la implicación de *TCTP* en señalización de dichos estreses, por ejemplo en respuesta a aluminio, frío, calor, salinidad, limitación de agua, estrés oxidativo e infección de virus (Ermolayev *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2007).

La gran homología que existe entre las secuencias aminoacídicas de TCTPs de plantas en comparación con las secuencias de TCTP no vegetales, observada en el alineamiento, indica que los TCTP de plantas y no plantas divergieron pronto, conclusión también soportada por el análisis filogenético. Por otra parte, los dominios funcionales para la interacción con proteínas específicas de animales y hongos como la quinasa Plk de control del ciclo celular (Yarm, 2002), la proteína antiapoptótica MCL/BCL (Yang *et al.*, 2005) y la Na⁺/K⁺-ATPasa (Jung *et al.*, 2004) no están conservados en *CsTCTP*, *QsTCTP* y *QrTCTP* ni en las otras proteínas TCTP vegetales que se compararon en el alineamiento, lo que indica que probablemente estas regiones no tengan las mismas funciones. De hecho, los homólogos de estas proteínas reguladoras de divisiones celulares no han sido identificados en los genomas de plantas (Lee y Amon, 2003; Yang-Yen, 2006). La ausencia de TCTP en bacterias también sugiere que el progenitor de la familia posiblemente se haya originado después de la divergencia de estos grupos. El árbol filogenético construido en este trabajo muestra agrupaciones que están de acuerdo con la filogenia propuesta para eucariotas, así los hongos forman un solo clado y las plantas y animales también forman clados distintos (Adl *et al.*, 2005). El alto nivel de conservación de las proteínas de Fágaceas con las de otras especies, concuerda con el alto nivel de conservación de estas proteínas entre diversos filos eucariotas (Mulenga y Azad, 2005; Venugopal, 2005; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Varios estudios sugieren que TCTP está implicada en la formación del embrión en animales y plantas, de hecho su silenciamiento conduce a la letalidad embrionaria por falta de proliferación y en consecuencia muerte celular (Hsu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Para determinar el posible papel del gen *TCTP* en procesos embriogénicos, comparamos el perfil de expresión en

embriones zigóticos y somáticos de castaño, analizando también su comportamiento en embriones somáticos de alcornoque. El análisis realizado durante la EZ mostró que el gen también se expresa en tejidos maternos, en el endospermo y endotelio de la semilla inmadura. La asociación de *TCTP* con el endospermo también se observó en ricino y *J. curcas* (Lu *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2011). Por otra parte, con respecto al desarrollo embrionario, *TCTP* muestra un comportamiento similar en ambos tipos de embriones, ya que su expresión está asociada a zonas meristemáticas (meristemo apical, meristemo radicular y procambium) y tejidos en proliferación (protodermis y cotiledones en crecimiento) de la misma manera que se había observado previamente en *Arabidopsis* (Berkowitz *et al.*, 2008). Se sabe que aunque *TCTP* se expresa ampliamente en muchos tejidos o tipos celulares, funciona como factor esencial para el crecimiento y el desarrollo de una manera específica de tejido y de tipo celular (Hsu *et al.*, 2007).

Asimismo, el patrón de expresión relativo y espacio-temporal, fue muy similar en el sistema de castaño y de alcornoque, con un incremento en los niveles de expresión en los embriones cotiledonares, mostrando como cabría esperar un papel conservado en ambas especies. Un patrón de expresión muy similar fue también descrito para *TCTP* de *L. leptoleptis*, expresión asociada con el mantenimiento del desarrollo normal de los embriones somáticos (Zhang *et al.*, 2013). De hecho la pérdida de función de *AtTCTP1* de *Arabidopsis* conduce a un retraso en el desarrollo del embrión (Brioudes *et al.*, 2010). El incremento significativo de los niveles de expresión observados mediante qPCR, pudiera estar en parte asociado a su expresión en la protodermis. Por otra parte la expresión asociada principalmente a los meristemos apical y radicular, está de acuerdo con el incremento detectado mediante qPCR, ya que supone un mayor actividad de división celular en esos tejidos a medida que progresa el desarrollo del embrión.

El patrón de expresión asociado a meristemos detectado durante el desarrollo de los embriones se mantuvo en el análisis de la expresión del gen llevado a cabo en tejidos postembrionarios. En el caso del meristemo apical, hay una clara asociación con división y crecimiento, así como con la iniciación de los órganos laterales, ya que también se localizó una expresión intensa en la zona periférica y en las células en crecimiento activo de los primordios foliares. En estas zonas hay una elevada actividad mitótica con respecto a la zona central del meristemo, donde se mantiene un grupo de células indeterminadas. Este patrón de expresión se repite también en las yemas axilares, con localización de la expresión de los genes *CsTCTP*, *QsTCTP* y *QrTCTP* en las zonas centrales y periféricas de la misma. Los resultados sugieren que en Fagáceas *TCTP* desempeña un papel en el desarrollo de los órganos laterales de la planta del mismo modo a lo observado previamente en maíz (Brooks *et al.*, 2009). La abundante expresión de *TCTP* en el meristemo radicular está de acuerdo con el patrón de expresión asociado a tejidos

meristemáticos y con división celular activa (Berkowitz *et al.*, 2008) pudiendo estar implicado en controlar el crecimiento mitótico mediante regulación de la proliferación celular (Brioudes *et al.*, 2010; Nakkaew *et al.*, 2010). Por otra parte la elevada expresión de TCTP en primordios de raíz de castaño, tras la inducción de RAs, corrobora una vez más la implicación de TCTP en división celular activa asociada a meristemas. En este caso, dado que el análisis se realizó en primordios que ya estaban emergiendo, no podemos inferir si el gen puede estar participando en la etapa de inducción de RAs, pero si podría estar asociada al mantenimiento de la capacidad meristemática y de la división de las células del primordio. La expresión en las primeras filas de célula de la columela, las cuales también mantienen su capacidad meristemática concuerda con la función de TCTP regulando la división celular en dichos tejidos. La asociación de la expresión de *TCTP* con las células que se van desprendiendo de la caliptra sugiere una implicación en la proliferación celular en este tejido como se observó en *P. sativum* durante la formación de células de borde (Woo y Hawes, 1997).

Además, la expresión de *TCTP* en brotes está asociada al procambium, tejido meristemático con elevada actividad mitótica, de manera similar a lo observado en *Arabidopsis* (Berkowitz *et al.*, 2008). La expresión de *TCTP* detectada en el tejido vascular de los brotes, está de acuerdo con el papel propuesto de TCTP en movimiento a larga distancia a través del floema regulando el destino de proteínas floemáticas (Du *et al.*, 2015), aunque nosotros no podemos asegurarlo en nuestro sistema. El movimiento a larga distancia en TCTP de plantas apoya la noción de que algunas de ellas actúan de una manera autónoma de la célula, como HRF en animales (Kang *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis* se vio que TCTP está implicado en la iniciación o la extensión temprana del meristemo de raíces laterales. TCTP se expresa muy pronto en el sitio donde ocurren las primeras divisiones celulares en el periciclo para iniciar el primordio de la raíz lateral. Durante la formación del primordio se expresa en el mismo localizándose en las zonas meristemática y de división de la raíz lateral en desarrollo (Berkowitz *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* TCTP también puede tener una implicación en la aparición de raíces aéreas en la planta (Toscano-Morales *et al.*, 2014) y su movimiento parece correlacionarse con la formación de RA en tabaco (Toscano-Morales *et al.*, 2015). TCTP también se reveló como un gen importante para la formación de raíces de almacenamiento en la yuca (de Souza *et al.*, 2004). Las diferencias observadas entre los patrones de expresión entre raíz primaria y raíz adventicia pueden ser debidas a las diferentes condiciones de crecimiento ya que se sabe que citoquininas, auxina, ácido giberélico y brasinoesteroides pueden inducir o reprimir la localización de TCTP (Toscano-morales *et al.*, 2015). Además se sabe que TCTP regula la homeostasis de auxinas

(Berkowitz *et al.*, 2008). Todo ello apunta a un papel importante de TCTP en relación con el mantenimiento del meristemo apical de la raíz.

El silenciamiento de TCTP disminuye el crecimiento vegetativo (Berkowitz *et al.*, 2008). El crecimiento de un organismo y su determinación de tamaño requiere de una estrecha regulación de la proliferación y el crecimiento celular. El hecho de que AtTCTP1 pueda rescatar completamente los defectos en proliferación celular en *Drosophila* con pérdida de función de TCTP y a la inversa, indican una función conservada en regulación del crecimiento mitótico para TCTP entre plantas y animales (Brioudes *et al.*, 2010). La regulación del crecimiento celular de TCTP en plantas parece estar asociada a la vía de señalización TOR del mismo modo que en animales, de hecho algunos miembros homólogos de la red han sido identificados en plantas (Wulschleger *et al.*, 2006). El crecimiento está correlacionado con el nivel de expresión de la quinasa TOR que está controlada por GTPasas (Deprost *et al.*, 2007). En las proteínas TCTP de castaño, alcornoque y roble se ha localizado la región de unión a Rab GTPasas (Hsu *et al.*, 2007). Esta región está altamente conservada en todas las secuencias, y el dominio donde se encuentran muestra la misma configuración espacial en el modelado estructural a la observada en otras especies. Estos resultados sugieren que las proteínas TCTP de Fagáceas poseen una propiedad de unión a GTPasas, con un papel de en la activación de una Rheb GTPasa de plantas y podrían tener una función como mediador de la actividad de TOR similar a aquella conocida en sistemas no vegetales (Thaw *et al.*, 2001; Itzen *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2007). Además, los dominios de expresión observados en este trabajo coinciden en gran medida con los observados en *Arabidopsis* para TOR, donde se expresaba en embriones y en todos los meristemas, incluyendo MAR de raíz primaria y lateral así como en el MAB (Menand *et al.*, 2002). TCTP de Fagáceas podría tener una actividad como regulador positivo de la expresión de TOR y desempeñar un papel en crecimiento. El silenciamiento de TOR conduce a un arresto del crecimiento en un estadio embrionario temprano, del mismo modo que ocurría en *Arabidopsis* con TCTP, lo que indica que ambos son esenciales para el crecimiento de la planta (Menand *et al.*, 2002; Brioudes *et al.*, 2010).

Como TCTP parece jugar un papel crucial en ciclo celular y proliferación de las células durante el desarrollo en todos los organismos, los datos de expresión génica durante el desarrollo embrionario y postembrionario, asociada principalmente a tejidos meristemáticos, apuntan a una función conservada del gen en Fagáceas. Sería interesante analizar perfiles de expresión y caracterización de TOR, para confirmar el posible papel regulador de TCTP en la actividad de TOR. El análisis de expresión de TCTP en embriones y tejidos postembrionarios indica que juega un papel en el desarrollo temprano del embrión y que participa desde la etapa embrionaria en la regulación la actividad de los meristemas apical y radicular. Por ello parece estar

implicado en el mantenimiento del crecimiento y morfogénesis de la planta, regulando la actividad de los meristemos y participando en el desarrollo de órganos laterales y de raíz.







8. Conclusiones

1-La caracterización de los genes *CSAGO1*, *CsAGO4* y *CSAGO5* confirma que esta familia está conservada en Fagáceas. El análisis y modelización de las secuencias proteicas deducidas indica que pueden asociarse con sARNs, participando en el silenciamiento mediante escisión de ARN (AGO 1 y AGO5) o mediante silenciamiento transcripcional (AGO4).

2-El análisis de la secuencia *CPE* en especies distantes filogenéticamente confirma que es un gen muy conservado e indica que participa en procesos fundamentales con funciones biológicas evolutivamente conservadas.

3-El patrón de expresión espacio-temporal de los genes *CsCPE*, *CsSCLI* y *CsTCTP* en embriones zigóticos y somáticos de castaño indica que participan en el desarrollo embrionario y desempeñan funciones similares en ambos procesos.

3.1. El gen *CPE* parece estar involucrado en la iniciación y desarrollo de los cotiledones, germinación del embrión y en el establecimiento de la identidad de las células iniciales de la columela y sus derivadas.

3.2. La localización del transcrito *CsSCLI* durante el desarrollo embrionario, asociada al dominio basal en estadios muy tempranos y al tejido fundamental en estados más avanzados, le atribuye un papel importante en la organización de la raíz primaria y en el establecimiento del patrón radial del embrión, participando en la división asimétrica del tejido fundamental.

3.3. La localización del gen *TCTP* en tejidos en proliferación activa indica que puede estar regulando la división de células meristemáticas.

4-La expresión de los genes *CPE* y *SCLI* asociada exclusivamente a estructuras proembriónicas en la etapa de inducción de ES, así como en la protodermis de los embriones, indica que participan en la adquisición y mantenimiento de la competencia embriónica.

5-La localización de la expresión de *SCLI* en los brotes de castaño en respuesta a la auxina, únicamente en el cambium brotes competentes para enraizar, indica una implicación del gen en la determinación del destino de las células iniciales de raíz que darán lugar al meristemo radicular. Su expresión en los primordios de RA y RL y el patrón de expresión de *SCLI* en el ápice de la raíz indica un importante papel del gen en el mantenimiento del patrón radial de la raíz.

6- La dinámica de la expresión de los genes *CPE*, *CSLI* y *TCTP* durante el desarrollo postembrionario mantiene los dominios de expresión observados durante la embriogénesis.

6.1. La expresión de *CPE* sugiere que participa en la división las células de la capa L1 del ápice del brote y yemas laterales, así como en el mantenimiento de la identidad de las células de la columela.

6.2. La expresión de *SCL1* en las células iniciales y sus derivadas que rodean el CQ sugiere que está regulando las divisiones asimétricas y manteniendo el patrón radial de la raíz.

6.3. La expresión de *TCTP* indica una implicación del gen en mantenimiento de la actividad meristemática de la zona apical del brote, controlando el desarrollo de órganos laterales y por otra parte en el desarrollo de columela de la raíz.







9. Bibliografía

- Abarca, D. & Díaz-Sala, C. (2009) «Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species.», *Plant signaling & behavior*, 4(8), pp. 793-5. doi: 10.1093/treephys/28.11.1629.
- Abarca, D., Pizarro, A., Hernández, I., Sánchez, C., Solana, S. P., Del Amo, A., Carneros, E. & Díaz-Sala, C. (2014) «The GRAS gene family in pine: transcript expression patterns associated with the maturation-related decline of competence to form adventitious roots.», *BMC plant biology*, 14(1), p. 1583. doi: 10.1186/s12870-014-0354-8.
- Abid, G., Jacquemin, J., Sassi, K. & Muhovski, Y. (2010) «Gene expression and genetic analysis during higher plants embryogenesis», *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14(4), pp. 667-680.
- Acunzo, J., Baylot, V., So, A. & Rocchi, P. (2014) «TCTP as therapeutic target in cancers.», *Cancer treatment reviews*, 40(6), pp. 760-9. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.02.007.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V, Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. J. R. (2005) «The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.», *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52(5), pp. 399-451. doi: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Agorio, A. & Vera, P. (2007) «ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*.», *The Plant cell. American Society of Plant Biologists*, 19(11), pp. 3778-90. doi: 10.1105/tpc.107.054494.
- Aleith, F. & Richter, G. (1990) «Planta Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions», *Planta*, pp. 17-24.
- Alexis Ducouso & Sandor Bordacs (2004) «EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*).», p. 6.
- Alfenas-Zerbini, P., Maia, I. G., Fávaro, R. D., Cascardo, J. C. M., Brommonschenkel, S. H. & Zerbini, F. M. (2009) «Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus.», *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 22(3), pp. 352-361. doi: 10.1094/MPMI-22-3-0352.

de Almeida, M., de Almeida, C. V., Mendes Graner, E., Ebling Brondani, G. & Fiori de Abreu-Tarazi, M. (2012) «Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study.», *Plant cell reports*, 31(8), pp. 1495-515. doi: 10.1007/s00299-012-1264-6.

Álvarez, R., Alonso, P., Cortizo, M., Celestino, C., Hernández, I., Toribio, M. & Ordás, R. J. (2004) «Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees», *Plant Cell Reports*. Springer-Verlag, 23(4), pp. 218-223. doi: 10.1007/s00299-004-0810-2.

Amson, R., Karp, J. E. & Telerman, A. (2013) «Lessons from tumor reversion for cancer treatment.», *Current opinion in oncology*, 25(1), pp. 59-65. doi: 10.1097/CCO.0b013e32835b7d21.

Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., Colaluca, I., Viale, G., Rodrigues-Ferreira, S., Wynendaele, J., Chaloin, O., Hoebeke, J., Marine, J.-C., Di Fiore, P. P. & Telerman, A. (2012) «Reciprocal repression between P53 and TCTP.», *Nature medicine*, 18(1), pp. 91-9. doi: 10.1038/nm.2546.

Amson, R., Pece, S., Marine, J. C., Fiore, P. P. Di & Telerman, A. (2013) «TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming», *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 23(1), pp. 37-46. doi: 10.1016/j.tcb.2012.10.002.

Amzallag, N., Passer, B. J., Allanic, D., Segura, E., Thry, C., Goud, B., Amson, R. & Telerman, A. (2004) «TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway», *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), pp. 46104-46112. doi: 10.1074/jbc.M404850200.

Andree, H., Thiele, H., Föhling, M., Schmidt, I. & Thiele, B.-J. (2006) «Expression of the human TPT1 gene coding for translationally controlled tumor protein (TCTP) is regulated by CREB transcription factors.», *Gene*, 380(2), pp. 95-103. doi: 10.1016/j.gene.2006.05.018.

Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T. & Sakakibara, H. (2005) «Destination-selective long-distance movement of phloem proteins.», *The Plant cell*, 17(6), pp. 1801-1814. doi: 10.1105/tpc.105.031419.

Arcuri, F., Papa, S., Carducci, A., Romagnoli, R., Liberatori, S., Riparbelli, M. G., Sanchez, J.-C., Tosi, P. & del Vecchio, M. T. (2004) «Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity.», *The Prostate*, 60(2), pp. 130-40. doi: 10.1002/pros.20054.

- Arcuri, F., Papa, S., Meini, A., Carducci, A., Romagnoli, R., Bianchi, L., Riparbelli, M. G., Sanchez, J., Palmi, M., Tosi, P. & Cintonino, M. (2005) «The Translationally Controlled Tumor Protein Is a Novel Calcium Binding Protein of the Human Placenta and Regulates Calcium Handling in Trophoblast Cells 1», *Biology of Reproduction*, 75(1)(June), pp. 745-751. doi: 10.1095/biolreprod.105.042077.
- Argout, X., Salse, J., Aury, J.-M., Gaultier, M. J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., Legavre, T., Maximova, S. N., Abrouk, M., Murat, F., Fouet, O., Poulain, J., Ruiz, M., Roguet, Y., Rodier-Goud, M., Barbosa-Neto, J. F., Sabot, F., Kudrna, D., Ammiraju, J. S. S., Schuster, S. C., Carlson, J. E., Sallet, E., Schiex, T., Dievart, A., Kramer, M., Gelley, L., Shi, Z., Bérard, A., Viot, C., Boccara, M., Risterucci, A. M., Guignon, V., Sabau, X., Axtell, M. J., Ma, Z., Zhang, Y., Brown, S., Bourge, M., Golser, W., Song, X., Clement, D., Rivallan, R., Tahi, M., Akaza, J. M., Pitollat, B., Gramacho, K., D'Hont, A., Brunel, D., Infante, D., Kebe, I., Costet, P., Wing, R., McCombie, W. R., Guiderdoni, E., Quetier, F., Panaud, O., Wincker, P., Bocs, S. & Lanaud, C. (2011) «The genome of *Theobroma cacao*», *Nature Genetics*. *Nature Research*, 43(2), pp. 101-108. doi: 10.1038/ng.736.
- Arif, M. A., Frank, W. & Khraiwesh, B. (2013) «Role of RNA interference (RNAi) in the moss *Physcomitrella patens*», *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp. 1516-1540. doi: 10.3390/ijms14011516.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. (2002) «Developmental pathways of somatic embryogenesis», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Kluwer Academic Publishers, 69(3), pp. 233-249. doi: 10.1023/A:1015673200621.
- Arroyo-Herrera, A., Ku Gonzalez, A., Canche Moo, R., Quiroz-Figueroa, F. R., Loyola-Vargas, V. M., Rodriguez-Zapata, L. C., Burgeff D'Hondt, C., Suárez-Solís, V. M. & Castaño, E. (2008) «Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 94(2), pp. 171-180. doi: 10.1007/s11240-008-9401-1.
- Aukerman, M. J. & Sakai, H. (2003) «Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes.», *The Plant cell*, 15(11), pp. 2730-41. doi: 10.1105/tpc.016238.
- Axelrod, D. I. (1983) «Biogeography of Oaks in the Arcto-Tertiary Province», *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 70(4), p. 629. doi: 10.2307/2398982.
- Axtell, M. J. (2013) «Classification and comparison of small RNAs from plants.», *Annual review of plant biology*, 64(1), pp. 137-59. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043.

- Axtell, M. J., Snyder, J. A. & Bartel, D. P. (2007) «Common functions for diverse small RNAs of land plants.», *The Plant cell*, 19(6), pp. 1750-1769. doi: 10.1105/tpc.107.051706.
- Ba, Z. & Qi, Y. (2013) «Small RNAs: emerging key players in DNA double-strand break repair.», *Science China. Life sciences*, 56(10), pp. 933-6. doi: 10.1007/s11427-013-4552-7.
- Bacilieri, R., Ducousso, A., Petit, R. J. & Kremer, A. (1996) «Mating System and Asymmetric Hybridization in a Mixed Stand of European Oaks», *Evolution*, 50(2), p. 900. doi: 10.2307/2410861.
- Badowiec, A., Swigonska, S. & Weidner, S. (2013) «Changes in the protein patterns in pea (*Pisum sativum* L.) roots under the influence of long- and short-term chilling stress and post-stress recovery», *Plant Physiology and Biochemistry*, 71(November 2015), pp. 315-324. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.08.001.
- Bai, M., Yang, G.-S., Chen, W.-T., Mao, Z.-C., Kang, H.-X., Chen, G.-H., Yang, Y.-H. & Xie, B.-Y. (2012) «Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*.», *Gene*, 501(1), pp. 52-62. doi: 10.1016/j.gene.2012.02.009.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. & Van Staden, J. (2011) «Somaclonal variation in plants: causes and detection methods», *Plant Growth Regulation. Springer Netherlands*, 63(2), pp. 147-173. doi: 10.1007/s10725-010-9554-x.
- Ballester, A., San-José, M. C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. L. & Vieitez, A. M. (1999) «Anatomical and Biochemical Events during *in vitro* Rooting of Microcuttings from Juvenile and Mature Phases of Chestnut», *Annals of Botany. Oxford University Press*, 83(6), pp. 619-629. doi: 10.1006/anbo.1999.0865.
- Bard, J. (1994) *Embryos : color atlas of development*. Wolfe.
- Barnes, A., Bale, J., Constantinidou, C., Ashton, P., Jones, A. & Pritchard, J. (2004) «Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry.», *Journal of experimental botany*, 55(402), pp. 1473-81. doi: 10.1093/jxb/erh161.
- Barra-Jiménez, A. & Ragni, L. (2017) «Secondary development in the stem: when *Arabidopsis* and trees are closer than it seems», *Current Opinion in Plant Biology*, 35, pp. 145-151. doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.002.

- Barreneche, T., Bodenes, C., Lexer, C., Trontin, J.-F., Fluch, S., Streiff, R., Plomion, C., Roussel, G., Steinkellner, H., Burg, K., Favre, J.-M., Glössl, J., Kremer, A. & Glössl, J. (1998) «A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers», *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 97(7), pp. 1090-1103. doi: 10.1007/s001220050996.
- Barreneche, T., Casasoli, M., Russell, K., Akkak, A., Meddour, H., Plomion, C., Villani, F. & Kremer, A. (2004) «Comparative mapping between quercus and castanea using simple-sequence repeats (SSRs).», *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 108(3), pp. 558-66. doi: 10.1007/s00122-003-1462-2.
- Bassett, C. L., Wisniewski, M. E., Artlip, T. S., Norelli, J. L. & Farrell, R. E. (2006) «Global Analysis of Genes Regulated by Low Temperature and Photoperiod in Peach Bark», *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131(4), pp. 551-63.
- Baudet, C., Perret, E., Delpéch, B., Kaghad, M., Brachet, P., Wion, D. & Caput, D. (1998) «Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program.», *Cell death and differentiation*, 5(1), pp. 116-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4400327.
- Baulcombe, D. (2004) «RNA silencing in plants.», *Nature*, 431(7006), pp. 356-63. doi: 10.1038/nature02874.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D. C. (2005) «*Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), pp. 11928-11933. doi: 10.1073/pnas.0505461102.
- Baylot, V., Katsogiannou, M., Andrieu, C., Taieb, D., Acunzo, J., Giusiano, S., Fazli, L., Gleave, M., Garrido, C. & Rocchi, P. (2012) «Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer.», *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(12), pp. 2244-56. doi: 10.1038/mt.2012.155.
- Bazile, F., Pascal, A., Arnal, I., Le Clainche, C., Chesne, F. & Kubiak, J. Z. (2009) «Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells», *Carcinogenesis*, 30(4), pp. 555-565. doi: 10.1093/carcin/bgp022.
- Beeckman, T. & De Smet, I. (2014) «Pericycle», *Current Biology*, 24(10), pp. 378-379. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.031.

- Behm-Ansmant, I. (2006) «mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes», *Genes & Development*, 20(14), pp. 1885-1898. doi: 10.1101/gad.1424106.
- Bellarosa, R., Simeone, M. C., Papini, A. & Schirone, B. (2005) «Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.», *Molecular phylogenetics and evolution*, 34(2), pp. 355-70. doi: 10.1016/j.ympev.2004.10.014.
- Belmonte, M. F., Tahir, M., Schroeder, D. & Stasolla, C. (2007) «Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos», *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 58(11), pp. 2851-2861. doi: 10.1093/jxb/erm099.
- Benndorf, R., Nürnberg, P. & Bielka, H. (1988) «Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis», *Experimental Cell Research*, 174(1), pp. 130-138. doi: 10.1016/0014-4827(88)90148-6.
- Bentsink, L. & Koornneef, M. (2008) «Seed dormancy and germination.», *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists, 6, p. e0119. doi: 10.1199/tab.0119.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. & Masle, J. (2008) «Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*», *the Plant Cell Online*, 20(12), pp. 3430-3447. doi: 10.1105/tpc.108.061010.
- Bheekha-Escura, R., MacGlashan, D. W., Langdon, J. M. & MacDonald, S. M. (2000) «Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10.», *Blood*, 96(6), pp. 2191-2198.
- Bhisutthibhan, J., Pan, X. Q., Hossler, P. A., Walker, D. J., Yowell, C. A., Carlton, J., Dame, J. B. & Meshnick, S. R. (1998) «The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin.», *The Journal of biological chemistry*, 273(26), pp. 16192-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632675>.
- Bhisutthibhan, J., Philbert, M. a, Fujioka, H., Aikawa, M. & Meshnick, S. R. (1999) «The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding.», *European journal of cell biology*, 78(9), pp. 665-70. doi: 10.1016/S0171-9335(99)80052-1.
- Bini, L., Magi, B., Marzocchi, B., Arcuri, F., Tripodi, S., Cintorino, M., Sanchez, J.-C., Frutiger, Sév., Hughes, G., Pallini, V., Hochstrasser, D. F. & Tosi, P. (1997) «Protein expression profiles

in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue», Electrophoresis. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 18(15), pp. 2832-2841. doi: 10.1002/elps.1150181519.

Birol, I., Raymond, A., Jackman, S. D., Pleasance, S., Coope, R., Taylor, G. A., Yuen, M. M. Saint, Keeling, C. I., Brand, D., Vandervalk, B. P., Kirk, H., Pandoh, P., Moore, R. A., Zhao, Y., Mungall, A. J., Jaquish, B., Yanchuk, A., Ritland, C., Boyle, B., Bousquet, J., Ritland, K., Mackay, J., Bohlmann, J. & Jones, S. J. M. (2013) «Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data.», Bioinformatics (Oxford, England), 29(12), pp. 1492-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btt178.

Bocca, S. N., Magioli, C., Mangeon, A., Junqueira, R. M., Cardeal, V., Margis, R. & Sachetto-Martins, G. (2005) «Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag database (ForEST)», Genetics and Molecular Biology, 28(3 SUPPL.), pp. 608-624. doi: 10.1590/S1415-47572005000400016.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., Benning, C. & Banning, C. (1998) «AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development», EMBO Journal, 17(1), pp. 170-180. doi: 10.1093/emboj/17.1.170.

Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. (2011) «Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein.», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(26), pp. 10466-71. doi: 10.1073/pnas.1103946108.

Boland, A., Triteschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. (2010) «Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein.», EMBO reports, 11(7), pp. 522-7. doi: 10.1038/embor.2010.81.

Bolle, C. (2016a) «Chapter 10 – Structure and Evolution of Plant GRAS Family Proteins», en Plant Transcription Factors, pp. 153-161. doi: 10.1016/B978-0-12-800854-6.00010-5.

Bolle, C. (2016b) «Chapter 19 – Functional Aspects of GRAS Family Proteins», en Plant Transcription Factors, pp. 295-311. doi: 10.1016/B978-0-12-800854-6.00019-1.

Bommer, U.-A. (2012) «Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP», The Open Allergy Journal, 5(November), pp. 19-32. doi: 10.2174/1874838401205010019.

Bommer, U.-A., Borovjagin, A. V, Greagg, M. a, Jeffrey, I. W., Russell, P., Laing, K. G., Lee, M. & Clemens, M. J. (2002) «The mRNA of the translationally controlled tumor protein

P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR.», *RNA* (New York, N.Y.), 8, pp. 478-496. doi: 10.1017/S1355838202022586.

Bommer, U.-A., Heng, C., Perrin, A., Dash, P., Lobov, S., Elia, A. & Clemens, M. J. (2010) «Roles of the translationally controlled tumour protein (TCTP) and the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, in cellular stress responses.», *Oncogene*, 29(5), pp. 763-73. doi: 10.1038/onc.2009.380.

Bommer, U. A. & Thiele, B. J. (2004) «The translationally controlled tumour protein (TCTP)», *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(3), pp. 379-385. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00213-9.

Bonga, J. M., Klimaszevska, K. K. & von Aderkas, P. (2010) «Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Springer Netherlands, 100(3), pp. 241-254. doi: 10.1007/s11240-009-9647-2.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R. & Zhu, J.-K. (2005) «Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*.», *Cell*, 123(7), pp. 1279-91. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.035.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A. A. M., Miki, B. L. A., Custers, J. B. M. & van Lookeren Campagne, M. M. (2002) «Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth.», *The Plant cell. American Society of Plant Biologists*, 14(8), pp. 1737-49. doi: 10.1105/TPC.001941.

Braun, D. M., Stone, J. M. & Walker, J. C. (1997) «Interaction of the maize and *Arabidopsis* kinase interaction domains with a subset of receptor-like protein kinases: implications for transmembrane signaling in plants.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 12(1), pp. 83-95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9263453>.

Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M. & Izaurralde, E. (2011) «GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets.», *Molecular cell*, 44(1), pp. 120-33. doi: 10.1016/j.molcel.2011.09.007.

Briesemeister, S., Rahnenführer, J. & Kohlbacher, O. (2010a) «Going from where to why-interpretable prediction of protein subcellular localization», *Bioinformatics*, 26(9), pp. 1232-1238. doi: 10.1093/bioinformatics/btq115.

- Briesemeister, S., Rahnenführer, J. & Kohlbacher, O. (2010b) «YLoc-an interpretable web server for predicting subcellular localization», *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), pp. 497-502. doi: 10.1093/nar/gkq477.
- Brioudes, F., Thierry, A.-M., Chambrier, P., Mollereau, B. & Bendahmane, M. (2010) «Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp. 16384-9. doi: 10.1073/pnas.1007926107.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L. & Voinnet, O. (2008) «Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs.», *Science (New York, N.Y.)*, 320(5880), pp. 1185-90. doi: 10.1126/science.1159151.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Schaller, H., Khafif, M., Schott, G., Bendahmane, A. & Voinnet, O. (2012) «Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in *Arabidopsis*.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), pp. 1778-83. doi: 10.1073/pnas.1112500109.
- Brooks, L., Strable, J., Zhang, X., Ohtsu, K., Zhou, R., Sarkar, A., Hargreaves, S., Elshire, R. J., Eudy, D., Pawlowska, T., Ware, D., Janick-Buckner, D., Buckner, B., Timmermans, M. C. P., Schnable, P. S., Nettleton, D. & Scanlon, M. J. (2009) «Microdissection of shoot meristem functional domains», *PLoS Genetics*, 5(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1000476.
- Brosseau, C. & Moffett, P. (2015) «Functional and Genetic Analysis Identify a Role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing.», *The Plant cell*, 27(6), pp. 1742-54. doi: 10.1105/tpc.15.00264.
- Brown, D. C. W. & Thorpe, T. A. (1995) «Crop improvement through tissue culture», *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, 11(4), pp. 409-415. doi: 10.1007/BF00364616.
- Bruckner, F., Maia, I., Fontes, E., Zerbini, F. & Alfenas-Zerbini, P. (2013) «Effect of Tctp Overexpression in Pepymv Symptoms and Identification of Plant Proteins That Putatively Interact With Tctp During Pepymv Infection», *IV Simpósio brasileiro de genética molecular de plantas*, p. 41.
- Bruckner, F. P., Xavier, A. D. S., Cascardo, R. D. S., Otoni, W. C., Zerbini, F. M. & Alfenas-Zerbini, P. (2016) «Translationally controlled tumour protein (TCTP) from tomato and *Nicotiana benthamiana* is necessary for successful infection by a potyvirus.», *Molecular plant pathology*. doi: 10.1111/mpp.12426.

Burgess, a, Labbé, J.-C., Vigneron, S., Bonneaud, N., Strub, J. M., Van Dorsselaer, a, Lorca, T. & Castro, a (2008) «Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle.», *Oncogene*, 27(42), pp. 5554-66. doi: 10.1038/onc.2008.167.

Busov, V. B., Johannes, E., Whetten, R. W., Sederoff, R. R., Spiker, S. L., Lanz-Garcia, C. & Goldfarb, B. (2004) «An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein», *Planta*, 218(6), pp. 916-927. doi: 10.1007/s00425-003-1175-4.

Butler, E. D. & Gallagher, T. F. (2000) «Characterization of auxin-induced ARRO-1 expression in the primary root of *Malus domestica*», *Journal of experimental botany*, 51(351), pp. 1765-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053468>.

Cairney, J., Zheng, L., Cowels, A., Hsiao, J., Zismann, V., Liu, J., Ouyang, S., Thibaud-Nissen, F., Hamilton, J., Childs, K., Pullman, G. S., Zhang, Y., Oh, T. & Buell, C. R. (2006) «Expressed sequence tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis.», *Plant molecular biology*, 62(4-5), pp. 485-501. doi: 10.1007/s11103-006-9035-9.

Cans, C., Passer, B. J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., Fiucci, G., Goud, B., Mirande, M., Amson, R. & Telerman, A. (2003) «Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp. 13892-7. doi: 10.1073/pnas.2335950100.

Cao, B., Lu, Y., Chen, G. & Lei, J. (2010) «Functional characterization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene associated with growth and defense response in cabbage», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(2), pp. 217-226. doi: 10.1007/s11240-010-9769-6.

Cao, X. & Jacobsen, S. E. (2002) «Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing.», *Current biology : CB*, 12(13), pp. 1138-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121623>.

Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K. B., Montgomery, T. A., Nguyen, T., Cuperus, J. T. & Carrington, J. C. (2012) «Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants.», *The Plant cell*, 24(9), pp. 3613-29. doi: 10.1105/tpc.112.099945.

- Carmell, M. a., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J. (2002) «The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis», *Genes and Development*, 16(21), pp. 2733-2742. doi: 10.1101/gad.1026102.
- Casas-Mollano, J. A., Rohr, J., Kim, E. J., Balassa, E., Van Dijk, K. & Cerutti, H. (2008) «Diversification of the core RNA interference machinery in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of DCL1 in transposon silencing», *Genetics*, 179(1), pp. 69-81. doi: 10.1534/genetics.107.086546.
- Casasoli, M., Derory, J., Morera-Dutrey, C., Brendel, O., Porth, I., Guehl, J.-M., Villani, F. & Kremer, A. (2006) «Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map.», *Genetics*, 172(1), pp. 533-46. doi: 10.1534/genetics.105.048439.
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N. (2006) «ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins», *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), pp. 362-365. doi: 10.1093/nar/gkl124.
- Catry, F. X., Moreira, F., Duarte, I. & Acácio, V. (2009) «Factors affecting post-fire crown regeneration in cork oak (*Quercus suber* L.) trees», *European Journal of Forest Research*. Springer-Verlag, 128(3), pp. 231-240. doi: 10.1007/s10342-009-0259-5.
- Cerutti, H. & Casas-Mollano, J. A. (2006) «On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man.», *Current genetics*, 50(2), pp. 81-99. doi: 10.1007/s00294-006-0078-x.
- Chan, T. H. M., Chen, L., Liu, M., Hu, L., Zheng, B. J., Poon, V. K. M., Huang, P., Yuan, Y. F., Huang, J. D., Yang, J., Tsao, G. S. W. & Guan, X. Y. (2012) «Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development», *Hepatology*, 55(2), pp. 491-505. doi: 10.1002/hep.24709.
- Chang, T. H., Wu, L. C., Lee, T. Y., Chen, S. P., Huang, H. Da & Horng, J. T. (2013) «EuLoc: A web-server for accurately predict protein subcellular localization in eukaryotes by incorporating various features of sequence segments into the general form of Chou's PseAAC», *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(1), pp. 91-103. doi: 10.1007/s10822-012-9628-0.
- Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.-H., Sung, Z. R. & Goodrich, J. (2004) «Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*», *Development*, 131(21), pp. 5263-5276. doi: 10.1242/dev.01400.

- Chen, A.-P., Zhong, N.-Q., Qu, Z.-L., Wang, F., Liu, N. & Xia, G.-X. (2007) «Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase, in *Arabidopsis thaliana*.», *Journal of plant research*, 120(2), pp. 337-43. doi: 10.1007/s10265-006-0058-8.
- Chen, S. H., Wu, P.-S., Chou, C.-H., Yan, Y.-T., Liu, H., Weng, S.-Y. & Yang-Yen, H.-F. (2007) «A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue or cell type-specific manner», *Molecular biology of the cell*, 18(1), pp. 2525-2532. doi: 10.1091/mbc.E07.
- Chen, X. (2004) «A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development.», *Science* (New York, N.Y.), 303(5666), pp. 2022-5. doi: 10.1126/science.1088060.
- Chen, Y., Chen, X., Wang, H., Bao, Y. & Zhang, W. (2014) «Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize.», *Proteome science*, 12(1), p. 33 (1-18). doi: 10.1186/1477-5956-12-33.
- Chen, Y., Wang, Z. & Zhezhi, W. (2008) An Analysis of Molecular Structural Character and Function Prediction on Plant Translationally Controlled Tumor Protein, *Biotechnol Bull*. Disponible en: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SWJT200802029.htm.
- Chitpatima, S. (1988) «Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells.», *Nucleic acids ...*, 16(5), p. 3560. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC338237/>.
- Choi, J. W. & Lim, J. (2016) «Control of Asymmetric Cell Divisions during Root Ground Tissue Maturation», *Molecules and Cells*, 39(7), pp. 524-529. doi: 10.14348/molcells.2016.0105.
- Chou, K.-C. (2005) «Using amphiphilic pseudo amino acid composition to predict enzyme subfamily classes.», *Bioinformatics* (Oxford, England), 21(1), pp. 10-9. doi: 10.1093/bioinformatics/bth466.
- Chou, K.-C. & Shen, H.-B. (2007) «Large-scale plant protein subcellular location prediction.», *Journal of cellular biochemistry*, 100(3), pp. 665-78. doi: 10.1002/jcb.21096.
- Chou, K.-C. & Shen, H.-B. (2008) «Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms.», *Nature protocols*, 3(2), pp. 153-62. doi: 10.1038/nprot.2007.494.

- Chou, K. C. & Shen, H. Bin (2010) «Plant-mPLOC: A top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization», PLoS ONE, 5(6). doi: 10.1371/journal.pone.0011335.
- Chou, M., Xia, C., Feng, Z., Sun, Y., Zhang, D., Zhang, M., Wang, L. & Wei, G. (2015) «A translationally controlled tumor protein gene Rpf41 is required for the nodulation of Robinia pseudoacacia», Plant Molecular Biology. Springer Netherlands, pp. 1-14. doi: 10.1007/s11103-015-0424-9.
- Ciccio, A. & Elledge, S. J. (2010) «The DNA damage response: making it safe to play with knives.», Molecular cell, 40(2), pp. 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- Comps, B., Barrière, G., Merzeau, D. & Letouzey, J. (1987) «La variabilité alloenzymatique des hêtraies dans les sous-domaines medio- et eu-atlantiques d'Europe», Canadian Journal of Forest Research. NRC Research Press Ottawa, Canada, 17(9), pp. 1043-1049. doi: 10.1139/x87-160.
- Corredoira, E., Montenegro, D., San-José, M. C., Vieitez, A. M. & Ballester, A. (2004) «Agrobacterium-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures», Plant Cell Reports. Springer-Verlag, 23(5), pp. 311-318. doi: 10.1007/s00299-004-0804-0.
- Corredoira, E., Toribio, M. & Vieitez, A. M. (2014) «Clonal propagation via somatic embryogenesis in Quercus spp.», (October 2016). doi: 10.1201/b16714-13.
- Corredoira, E. & Vieitez, A. B. F. J. (2006) «Somatic Embryogenesis in Chestnut», (December). doi: 10.1007/7089.
- Corredoira, E., Vieitez, A. M., Carmen, M., José, S., Vieitez, F. J. & Ballester, A. (2016) «Advances in somatic embryogenesis and genetic transformation of European chestnut: Development of transgenic resistance to ink and blight disease», Vegetative Propagation of Forest Trees, (1), pp. 279-301. Disponible en: <http://www.iufro20902.org/Publications/index.html>.
- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. & Lin, H. (1998) «A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal.», Genes & development, 12(23), pp. 3715-27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851978>.
- Cucchi, U., Gianellini, L. M., De Ponti, A., Sola, F., Alzani, R., Patton, V., Pezzoni, A., Troiani, S., Saccardo, M. B., Rizzi, S., Giorgini, M. L., Cappella, P., Beria, I. & Valsasina, B. (2010) «Phosphorylation of TCTP as a marker for polo-like kinase-1 activity in vivo», Anticancer Research, 30(12), pp. 4973-4986.

Cui, H. (2012) «Killing two birds with one stone», *Plant Signaling & Behavior*, 7(6), pp. 701-703. doi: 10.4161/psb.20283.

Cui, H., Baum, S. F., Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Cui, H., Cui, H., Benfey, P. N., Cui, H., Benfey, P. N., Cui, H., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L., Wang, J. Y., Blilou, I., Scheres, B., Benfey, P. N., Cui, H., Kong, D., Wei, P., Hao, Y., Torii, K. U., Lee, J. S., Li, J., Gong, X., Flores-Vergara, M. A., Hong, J. H., Chu, H., Lim, J., Franks, R. G., Liu, Z., Xu, J., Heo, J. O., Chang, K. S., Kim, I. A., Lee, M. H., Lee, S. A., Song, S. K., Lee, M. M., Lim, J., Lee, S. A., Jang, S., Yoon, E. K., Heo, J. O., Chang, K. S., Choi, J. W., Dhar, S., Kim, G., Choe, J. E., Heo, J. B., al., et, Miyashima, S., Hashimoto, T., Nakajima, K., Paquette, A. J., Benfey, P. N., Wu, S., Lee, C. M., Hayashi, T., Price, S., Divol, F., Henry, S., Pauluzzi, G., Perin, C. & Gallagher, K. L. (2016) «Middle Cortex Formation in the Root: An Emerging Picture of Integrated Regulatory Mechanisms», *Molecular Plant. Elsevier*, 9(6), pp. 771-773. doi: 10.1016/j.molp.2016.05.002.

Cui, H. & Benfey, P. N. (2009) «Cortex proliferation: simple phenotype, complex regulatory mechanisms.», *Plant signaling & behavior*. Taylor & Francis, 4(6), pp. 551-3. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03839.x.

Czech, B., Zhou, R., Erlich, Y., Brennecke, J., Binari, R., Villalta, C., Gordon, A., Perrimon, N. & Hannon, G. J. (2009) «Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*.», *Molecular cell*, 36(3), pp. 445-56. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.028.

Deng, W., Luo, K., Li, Z. & Yang, Y. (2009) «A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis», *Plant Science*, 177(1), pp. 43-48. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.03.009.

Deng, Z., Chen, J., Leclercq, J., Zhou, Z., Liu, C., Liu, H., Yang, H., Montoro, P., Xia, Z. & Li, D. (2016) «Expression Profiles, Characterization and Function of HbTCTP in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)», *Frontiers in Plant Science*, 7(June). doi: 10.3389/fpls.2016.00789.

Denk, T., Grimm, G. W., Taxon, S. & April, N. (2010) «The oaks of western Eurasia : Traditional classifications and evidence from two nuclear markers MOLECULAR PHYLOGENETICS The oaks of western Eurasia: from two nuclear markers Traditional classifications and evidence», 59(2), pp. 351-366. doi: 10.2307/25677595.

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C. & Meyer, C. (2007) «The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation», *EMBO reports*, 8(9), pp. 864-870. doi: 10.1038/sj.embor.7401043.

- Díaz-Sala, C., Garrido, G. & Sabater, B. (2002) «Age-related loss of rooting capability in *Arabidopsis thaliana* and its reversal by peptides containing the Arg-Gly-Asp (RGD) motif.», *Physiologia plantarum*, 114(4), pp. 601-607. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975735>.
- Díaz-Sala, C., Hutchison, K. W., Goldfarb, B. & Greenwood, M. S. (1996) «Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity», *Physiologia Plantarum*. Blackwell Publishing Ltd, 97(3), pp. 481-490. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00507.x.
- Diraison, F., Hayward, K., Sanders, K. L., Brozzi, F., Lajus, S., Hancock, J., Francis, J. E., Ainscow, E., Bommer, U. A., Molnar, E., Avent, N. D. & Varadi, A. (2011) «Translationally controlled tumour protein (TCTP) is a novel glucose-regulated protein that is important for survival of pancreatic beta cells.», *Diabetologia*, 54(2), pp. 368-79. doi: 10.1007/s00125-010-1958-7.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G. & Kreis, M. (1997) «Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis», 48(313), pp. 1493-1509.
- Dow, B. D. & Ashley, M. V. (1996) «Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*», *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 5(5), pp. 615-627. doi: 10.1111/j.1365-294X.1996.tb00357.x.
- Du, B., Wei, Z., Wang, Z., Wang, X., Peng, X., Du, B., Chen, R., Zhu, L. & He, G. (2015) «Phloem-exudate proteome analysis of response to insect brown plant-hopper in rice», *Journal of Plant Physiology*, 183, pp. 13-22. doi: 10.1016/j.jplph.2015.03.020.
- Durzan, D. J. (1990) «Adult vs. Juvenile Explants: Directed Totipotency», en *Plant Aging*. Boston, MA: Springer US, pp. 19-25. doi: 10.1007/978-1-4684-5760-5_3.
- Eamens, A. L., Smith, N. A., Curtin, S. J., Wang, M.-B. & Waterhouse, P. M. (2009) «The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes.», *RNA* (New York, N.Y.), 15(12), pp. 2219-2235. doi: 10.1261/rna.1646909.
- Earley, K. W. & Poethig, R. S. (2011) «Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*.», *The Journal of biological chemistry*, 286(44), pp. 38184-9. doi: 10.1074/jbc.M111.290130.

- Elhiti, M., Hebelstrup, K. H., Wang, A., Li, C., Cui, Y., Hill, R. D. & Stasolla, C. (2013) «Function of type-2 *Arabidopsis* hemoglobin in the auxin-mediated formation of embryogenic cells during morphogenesis», *The Plant Journal*, 74(6), pp. 946-958. doi: 10.1111/tpj.12181.
- Elhiti, M., Stasolla, C. & Wang, A. (2013) «Molecular regulation of plant somatic embryogenesis», *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. Springer US, 49(6), pp. 631-642. doi: 10.1007/s11627-013-9547-3.
- Elhiti, M., Tahir, M., Gulden, R. H., Khamiss, K. & Stasolla, C. (2010) «Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem», *Journal of Experimental Botany*, 61(14), pp. 4069-4085. doi: 10.1093/jxb/erq222.
- Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, A. D., Greene, E. M., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. (2012) «The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a.», *Cell*, 150(1), pp. 100-110. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.017.
- Ermolayev, V., Weschke, W. & Manteuffel, R. (2003) «Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars», *Journal of Experimental Botany*, 54(393), pp. 2745-2756. doi: 10.1093/jxb/erg302.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. (2008) «Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing.», *Cell*, 132(1), pp. 9-14. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.024.
- Evert, R. F. (2006) «Periderm», en *Esau's Plant Anatomy*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 427-445. doi: 10.1002/0470047380.ch15.
- Fabian, M. R., Cieplak, M. K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T. F. & Sonenberg, N. (2011) «miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT.», *Nature structural & molecular biology*, 18(11), pp. 1211-7. doi: 10.1038/nsmb.2149.
- Faehnle, C. R., Elkayam, E., Haase, A. D., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. (2013) «The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1», *Cell Reports*. Elsevier, 3(6), pp. 1901-1909. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.033.
- Fang, X. & Qi, Y. (2016) «RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View», *The Plant Cell*, 28(February), pp. 272-285. doi: 10.1105/tpc.15.00920.

- Fehér, A., Pasternak, T. P. & Dudits, D. (2003) «Transition of somatic plant cells to an embryogenic state», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Kluwer Academic Publishers, 74(3), pp. 201-228. doi: 10.1023/A:1024033216561.
- Fei, Q., Xia, R. & Meyers, B. C. (2013) «Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks.», *The Plant cell*, 25(7), pp. 2400-15. doi: 10.1105/tpc.113.114652.
- Felsenstein, J. (1985) «Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap», *Evolution*, 39(4), pp. 783-791.
- Feng, Y., Liu, D., Yao, H. & Wang, J. (2007) «Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR.», *Archives of biochemistry and biophysics*, 467(1), pp. 48-57. doi: 10.1016/j.abb.2007.08.021.
- Fenner, B. J., Scannell, M. & Prehn, J. H. M. (2010) «Expanding the substantial interactome of NEMO using protein microarrays.», *PloS one. Public Library of Science*, 5(1), p. e8799. doi: 10.1371/journal.pone.0008799.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J. & Bateman, A. (2015) «The Pfam protein families database: towards a more sustainable future.», *Nucleic acids research*, 44(D1), pp. D279-D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344.
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N. & Nagar, B. (2012) «*Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs.», *The EMBO journal*, 31(17), pp. 3588-95. doi: 10.1038/emboj.2012.204.
- Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B. (2010) «Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2.», *Nature*, 465(7299), pp. 818-22. doi: 10.1038/nature09039.
- Frishman, D. & Argos, P. (1995) «Knowledge-based protein secondary structure assignment.», *Proteins*, 23(4), pp. 566-79. doi: 10.1002/prot.340230412.
- Fu, Z. Q., Guo, M., Jeong, B., Tian, F., Elthon, T. E., Cerny, R. L., Staiger, D. & Alfano, J. R. (2007) «A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity.», *Nature*, 447(7142), pp. 284-8. doi: 10.1038/nature05737.

- Fujita, T., Felix, K., Pinkaew, D., Hutadilok-Towatana, N., Liu, Z. & Fujise, K. (2008) «Human fortilin is a molecular target of dihydroartemisinin.», *FEBS letters*, 582(7), pp. 1055-60. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.055.
- Fusaro, A. F., Bocca, S. N., Ramos, R. L. B., Barrôco, R. M., Magioli, C., Jorge, V. C., Coutinho, T. C., Rangel-Lima, C. M., De Rycke, R., Inzé, D., Engler, G. & Sachetto-Martins, G. (2007) «AtGRP2, a cold-induced nucleocytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development.», *Planta*, 225(6), pp. 1339-51. doi: 10.1007/s00425-006-0444-4.
- Fusaro, A. F. & Sachetto-Martins, G. (2007) «Blooming time for plant glycine-rich proteins.», *Plant signaling & behavior*. Landes Bioscience, 2(5), pp. 386-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704608>.
- Fusaro, A., Mangeon, A., Junqueira, R. M., Rocha, C. A. B., Coutinho, T. C., Margis, R. & Sachetto-Martins, G. (2001) «Classification, expression pattern and comparative analysis of sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding glycine-rich proteins (GRPs)», *Genetics and Molecular Biology*, 24(1-4), pp. 263-273. doi: 10.1590/S1415-47572001000100035.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, a, Poulton, T. & Bommer, U. a (1999) «The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle.», *Journal of cell science*, 112 (Pt 8, pp. 1257-1271.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. & Scheres, B. (2007) «PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development», *Nature*. Nature Publishing Group, 449(7165), pp. 1053-1057. doi: 10.1038/nature06206.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H. & Huijser, P. (2007) «The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49(4), pp. 683-93. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02983.x.
- Gao, M., Wei, W., Li, M.-M., Wu, Y.-S., Ba, Z., Jin, K.-X., Li, M.-M., Liao, Y.-Q., Adhikari, S., Chong, Z., Zhang, T., Guo, C.-X., Tang, T.-S., Zhu, B.-T., Xu, X.-Z., Mailand, N., Yang, Y.-G., Qi, Y. & Rendtlew Danielsen, J. M. (2014) «Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination.», *Cell research*. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 24(5), pp. 532-41. doi: 10.1038/cr.2014.36.

- Gasciolli, V., Mallory, A. C., Bartel, D. P. & Vaucheret, H. (2005) «Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs.», *Current biology* : CB, 15(16), pp. 1494-500. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.024.
- Ge, X.-X., Chai, L.-J., Liu, Z., Wu, X.-M., Deng, X.-X. & Guo, W.-W. (2012) «Transcriptional profiling of genes involved in embryogenic, non-embryogenic calluses and somatic embryogenesis of Valencia sweet orange by SSH-based microarray», *Planta*, 236(4), pp. 1107-1124. doi: 10.1007/s00425-012-1661-7.
- Geisler, M. & Bailly, A. (2007) «Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development», *Trends in Plant Science*, 12(10), pp. 465-473. doi: 10.1016/j.tplants.2007.08.015.
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F. S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., Jorrín-Novo, J. V. & Salekdeh, G. H. (2013) «Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley», *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 94, pp. 289-301. doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.017.
- Giarola, V., Krey, S., von den Driesch, B. & Bartels, D. (2016) «The Craterostigma plantagineum glycine-rich protein CpGRP1 interacts with a cell wall-associated protein kinase 1 (CpWAK1) and accumulates in leaf cell walls during dehydration», *New Phytologist*, 210(2), pp. 535-550. doi: 10.1111/nph.13766.
- Gil, B., Pastoriza, E., Ballester, A. & Sánchez, C. (2003) «Isolation and characterization of a cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots.», *Tree physiology*, 23(9), pp. 633-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750056>.
- Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B. & Gaj, M. D. (2013) «Extensive Modulation of the Transcription Factor Transcriptome during Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*», *PLoS ONE*, 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0069261.
- Gnanasekar, M., Dakshinamoorthy, G. & Ramaswamy, K. (2009) «Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity», *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 386(2), pp. 333-337. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.028.
- Gnanasekar, M. & Ramaswamy, K. (2007) «Translationally controlled tumor protein of *Brugia malayi* functions as an antioxidant protein.», *Parasitology research*, 101(6), pp. 1533-40. doi: 10.1007/s00436-007-0671-z.
- Gnanasekar, M., Rao, K. V. N., Chen, L., Narayanan, R. B., Geetha, M., Scott, a. L., Ramaswamy, K. & Kaliraj, P. (2002) «Molecular characterization of a calcium binding

translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*», *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(1), pp. 107-118. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00027-0.

Gnanasekar, M., Thirugnanam, S., Zheng, G., Chen, A. & Ramaswamy, K. (2009) «Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells.», *International journal of oncology*, 34(5), pp. 1241-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360337>.

Goldberg, R. B., de Paiva, G. & Yadegari, R. (1994) «Plant embryogenesis: zygote to seed.», *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 266(5185), pp. 605-14. doi: 10.1126/science.266.5185.605.

Gong, X., Flores-Vergara, M. A., Hong, J. H., Chu, H., Lim, J., Franks, R. G., Liu, Z. & Xu, J. (2016) «SEUSS integrates gibberellin signaling with transcriptional inputs from the SHR-SCR-SCL3 module to regulate middle cortex formation in the *Arabidopsis* root», *Plant Physiology*, 170(March), p. pp.01501.2015. doi: 10.1104/pp.15.01501.

Graidist, P., Phongdara, A. & Fujise, K. (2004) «Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity.», *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp. 40868-75. doi: 10.1074/jbc.M401454200.

Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C. C.-J., Chang, J.-Y., Phongdara, A. & Fujise, K. (2007) «Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo.», *The Biochemical journal*, 408(2), pp. 181-191. doi: 10.1042/BJ20070679.

Greenwood, M. S. & Hutchison, K. W. (1993) «Maturation as a Developmental Process», en *Clonal Forestry I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 14-33. doi: 10.1007/978-3-642-84175-0_3.

Greenwood, M. S. S. (1987) «Rejuvenation of forest trees», *Plant Growth Regulation*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 6(56), pp. 1-12. doi: 10.1007/BF00043947.

Greenwood, M. S. & Weir, R. J. (1995) «Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyl cuttings.», *Tree physiology*, 15(1), pp. 41-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966010>.

Greulich, H., Kaplan, B., Mertins, P., Chen, T.-H., Tanaka, K. E., Yun, C.-H., Zhang, X., Lee, S.-H., Cho, J., Ambrogio, L., Liao, R., Imielinski, M., Banerji, S., Berger, A. H., Lawrence, M. S., Zhang, J., Pho, N. H., Walker, S. R., Winckler, W., Getz, G., Frank, D., Hahn, W. C., Eck, M. J., Mani, D. R., Jaffe, J. D., Carr, S. A., Wong, K.-K. & Meyerson, M. (2012) «Functional

- analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2», *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences*, 109(36), pp. 14476-14481. doi: 10.1073/pnas.1203201109.
- Gross, B., Gaestel, M., Böhm, H. & Bielka, H. (1989) «cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein.», *Nucleic acids research*, 17(20), p. 8367. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334973/pdf/nar00137-0336.pdf>.
- Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F. & Kay, M. A. (2012) «Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain.», *Current biology: CB*, 22(16), pp. 1536-42. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.040.
- Guilfoyle, T. J. & Hagen, G. (2007) «Auxin response factors», *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), pp. 453-460. doi: 10.1016/j.pbi.2007.08.014.
- Gupta, M., Yoshioka, H., Ohnishi, K., Mizumoto, H., Hikichi, Y. & Kiba, A. (2013) «A translationally controlled tumor protein negatively regulates the hypersensitive response in *nicotiana benthamiana*», *Plant and Cell Physiology*, 54(8), pp. 1403-1414. doi: 10.1093/pcp/pct090.
- Haag, J. R., Ream, T. S., Marasco, M., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Pasa-Tolic, L. & Pikaard, C. S. (2012) «In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing.», *Molecular cell*, 48(5), pp. 811-8. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.027.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. & Laux, T. (2004) «Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*», *Development*, 131(3).
- Haghighat, N. G. & Ruben, L. (1992) «Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins», *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51(1), pp. 99-110. doi: 10.1016/0166-6851(92)90205-X.
- Hall, T., Biosciences, I. & Carlsbad, C. (2011) «BioEdit: An important software for molecular biology», *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(June), pp. 60-61. doi: 10.1002/prot.24632.
- Hall, T. M. T. (2005) «Structure and function of argonaute proteins.», *Structure (London, England : 1993)*, 13(10), pp. 1403-8. doi: 10.1016/j.str.2005.08.005.

- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999) «A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.», *Science* (New York, N.Y.), 286(5441), pp. 950-2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542148>.
- Han, K.-H., Shin, D. H., Yang, J., Kim, I. J., Oh, S. K. & Chow, K. S. (2000) «Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis*.», *Tree physiology*, 20(8), pp. 503-510. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651430>.
- Hao, Y. & Cui, H. (2012) «SHORT-ROOT regulates vascular patterning, but not apical meristematic activity in the *Arabidopsis* root through cytokinin homeostasis.», *Plant signaling & behavior*, 7(3), pp. 314-7. doi: 10.4161/psb.19118.
- Harding, E. W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E. & Perry, S. E. (2003) «Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15.», *Plant physiology. American Society of Plant Biologists*, 133(2), pp. 653-63. doi: 10.1104/pp.103.023499.
- Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., Merkl, R. & Meister, G. (2013) «Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes.», *Nature structural & molecular biology. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.*, 20(7), pp. 814-7. doi: 10.1038/nsmb.2577.
- Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. A., Dunn, R. M., Schwach, F., Doonan, J. H. & Baulcombe, D. C. (2010) «The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci.», *The Plant cell*, 22(2), pp. 321-334. doi: 10.1105/tpc.109.072199.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A. T., Pontes, O., Pikaard, C. S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H. & Zhu, J.-K. (2009) «An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein.», *Cell*, 137(3), pp. 498-508. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.028.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V, Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U. & de Vries, S. C. (2001) «The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture.», *Plant physiology. American Society of Plant Biologists*, 127(3), pp. 803-16. doi: 10.1104/PP.010324.
- Heidmann, I., de Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G. C. & Boutilier, K. (2011) «Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor», *Plant Cell Reports*, 30(6), pp. 1107-1115. doi: 10.1007/s00299-011-1018-x.

- Heidstra, R. & Sabatini, S. (2014) «Plant and animal stem cells: similar yet different.», *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(5), pp. 301-12. doi: 10.1038/nrm3790.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M. T. & Benfey, P. N. (2000) «The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling.», *Cell*, 101(5), pp. 555-67. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850497>.
- Helleboid, S., Chapman, A., Hendriks, T., Inzé, D., Vasseur, J. & Hilbert, J. L. (2000) «Cloning of beta-1,3-glucanases expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis.», *Plant molecular biology*, 42(2), pp. 377-86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794537>.
- Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inzé, D., Vasseur, J. & Hilbert, J. L. (2000) «Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins.», *Journal of experimental botany*, 51(348), pp. 1189-200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10937694>.
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J. & Jacobsen, S. E. (2006) «Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning.», *Nature genetics*, 38(6), pp. 721-5. doi: 10.1038/ng1804.
- Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T. & Baulcombe, D. C. (2005) «RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA.», *Science (New York, N.Y.)*, 308(5718), pp. 118-20. doi: 10.1126/science.1106910.
- Hinojosa-Moya, J. J., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., Arturo Ramirez-Ortega, F., Luis Cabrera-Ponce, J. & Ruiz-Medrano, R. (2013) «Characterization of the pumpkin Translationally-Controlled Tumor Protein CmTCTP.», *Plant signaling & behavior*, 8(12), pp. 1-8. doi: 10.4161/psb.26477.
- Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W. & Ruiz-Medrano, R. (2006) «Differential accumulation of a Translationally Controlled Tumor Protein mRNA from *Cucurbita maxima* (pumpkin) in response to CMV infection», *Biology of plant microbe interactions*, 5, pp. 242-246.
- Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W. J. & Ruiz-Medrano, R. (2008) «Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins.», *Journal of molecular evolution*, 66(5), pp. 472-83. doi: 10.1007/s00239-008-9099-z.

- Hirakawa, H., Nakamura, Y., Kaneko, T., Isobe, S., Sakai, H., Kato, T., Hibino, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Yamada, M., Nakayama, S., Fujishiro, T., Kishida, Y., Kohara, M., Tabata, S. & Sato, S. (2011) «Survey of the genetic information carried in the genome of *Eucalyptus camaldulensis*», *Plant Biotechnology*. Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology, 28(5), pp. 471-480. doi: 10.5511/plantbiotechnology.11.1027b.
- Hochholdinger, F. & Zimmermann, R. (2008) «Conserved and diverse mechanisms in root development», *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), pp. 70-74. doi: 10.1016/j.pbi.2007.10.002.
- Höck, J. & Meister, G. (2008) «The Argonaute protein family.», *Genome biology*, 9(2), p. 210. doi: 10.1186/gb-2008-9-2-210.
- Hoepflinger, M. C., Reitsamer, J., Geretschlaeger, A. M., Mehlmer, N. & Tenhaken, R. (2013) «The effect of translationally controlled tumour protein (TCTP) on programmed cell death in plants.», *BMC plant biology*. BMC Plant Biology, 13(1), p. 135. doi: 10.1186/1471-2229-13-135.
- Hou, L.-J. & Zhai, J.-J. (2015) «Aberrant expression profile of translationally controlled tumor protein and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer.», *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 20(6), pp. 1504-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854447>.
- Houghton, R. A., Hall, F. & Goetz, S. J. (2009) «Importance of biomass in the global carbon cycle», *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 114(G2), p. n/a-n/a. doi: 10.1029/2009JG000935.
- ten Hove, C. A., Lu, K.-J. & Weijers, D. (2015) «Building a plant: cell fate specification in the early *Arabidopsis* embryo.», *Development (Cambridge, England)*, 142(3), pp. 420-430. doi: 10.1242/dev.111500.
- Hsu, Y.-C., Chern, J. J., Cai, Y., Liu, M. & Choi, K.-W. (2007) «*Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase.», *Nature*, 445(February), pp. 785-788. doi: 10.1038/nature05528.
- Hu, H., Xiong, L. & Yang, Y. (2005) «Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection», *Planta*, 222(1), pp. 107-117. doi: 10.1007/s00425-005-1534-4.
- Hu, J., Wang, K., Huang, W., Liu, G., Gao, Y., Wang, J., Huang, Q., Ji, Y., Qin, X., Wan, L., Zhu, R., Li, S., Yang, D. & Zhu, Y. (2012) «The rice pentatricopeptide repeat protein RF5

restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162.», *The Plant cell*, 24(1), pp. 109-22. doi: 10.1105/tpc.111.093211.

Hughes, G. J., Frutiger, S., Paquet, N., Pasquali, C., Sanchez, J. C., Tissot, J. D., Bairoch, A., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. (1993) «Human liver protein map: update 1993.», *Electrophoresis*, 14(11), pp. 1216-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8313870>.

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K. & Preiss, T. (2005) «MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), pp. 16961-6. doi: 10.1073/pnas.0506482102.

Hur, J. K., Zinchenko, M. K., Djuranovic, S. & Green, R. (2013) «Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3' end interactions with the N-terminal lobe.», *The Journal of biological chemistry*, 288(11), pp. 7829-40. doi: 10.1074/jbc.M112.441030.

Hutchison, K. W., Singer, P. B., McInnis, S., Diaz-Sala, C. & Greenwood, M. S. (1999) «Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin.», *Plant physiology*, 120(3), pp. 827-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398718>.

Hutvagner, G. & Simard, M. J. (2008) «Argonaute proteins: key players in RNA silencing.», *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 9(1), pp. 22-32. doi: 10.1038/nrm2321.

Ikeda, M., Umehara, M. & Kamada, H. (2006) «Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*», *Plant Biotechnology*, 23(2), pp. 153-161. doi: 10.5511/plantbiotechnology.23.153.

Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2012) «Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants.», *The EMBO journal*, 31(2), pp. 267-78. doi: 10.1038/emboj.2011.395.

Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2010) «In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90», *Molecular Cell*. Elsevier Ltd, 39(2), pp. 282-291. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.014.

Itoh, J. -i., Sato, Y., Sato, Y., Hibara, K. -i., Shimizu-Sato, S., Kobayashi, H., Takehisa, H., Sanguinet, K. A., Namiki, N. & Nagamura, Y. (2016) «Genome-wide analysis of spatio-

temporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice», *Development*, (February), pp. 1217-1227. doi: 10.1242/dev.123661.

Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R. S., Alexandrov, K. & Rak, A. (2006) «Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4.», *The EMBO journal*, 25(7), pp. 1445-55. doi: 10.1038/sj.emboj.7601044.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T. & Tomari, Y. (2010) «Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes.», *Molecular cell*, 39(2), pp. 292-9. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.

Iwasaki, S., Sasaki, H. M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H. & Tomari, Y. (2015) «Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex.», *Nature*, 521(7553), pp. 533-6. doi: 10.1038/nature14254.

Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F., Weissenbach, J., Quétier, F. & Wincker, P. (2007) «The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla», *Nature*. Nature Publishing Group, 449(7161), pp. 463-467. doi: 10.1038/nature06148.

Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R. E., Kim, Y. J., Dinh, T. T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G. & Chen, X. (2011) «ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*.», *PLoS genetics*. Public Library of Science, 7(3), p. e1001358. doi: 10.1371/journal.pgen.1001358.

Jiang, Q., Ma, X., Gong, X., Zhang, J., Teng, S., Xu, J., Lin, D. & Dong, Y. (2014) «The rice OsDG2 encoding a glycine-rich protein is involved in the regulation of chloroplast development during early seedling stage.», *Plant cell reports*, 33(5), pp. 733-44. doi: 10.1007/s00299-013-1549-4.

Jin, F., Hu, L., Yuan, D., Xu, J., Gao, W., He, L., Yang, X. & Zhang, X. (2014) «Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence

- for stress response functions in SE development.», *Plant biotechnology journal*, 12(2), pp. 161-73. doi: 10.1111/pbi.12123.
- Jinek, M. & Doudna, J. A. (2009) «A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference.», *Nature*, 457(7228), pp. 405-12. doi: 10.1038/nature07755.
- Johansson, H., Svensson, F., Runnberg, R., Simonsson, T. & Simonsson, S. (2010) «Phosphorylated nucleolin interacts with translationally controlled tumor protein during mitosis and with Oct4 during interphase in ES cells», *PLoS ONE*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013678.
- Johansson, H., Vizlin-Hodzic, D., Simonsson, T. & Simonsson, S. (2010) «Translationally controlled tumor protein interacts with nucleophosmin during mitosis in ES cells», *Cell Cycle*, 9(11), pp. 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0013678.
- Johnson, T. M., Antrobus, R. & Johnson, L. N. (2008) «Plk1 activation by Ste20-like kinase (Slk) phosphorylation and polo-box phosphopeptide binding assayed with the substrate translationally controlled tumor protein (TCTP).», *Biochemistry*, 47(12), pp. 3688-96. doi: 10.1021/bi702134c.
- Jones, A. M. E., Thomas, V., Bennett, M. H., Mansfield, J. & Grant, M. (2006) «Modifications to the *Arabidopsis* Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*», *Plant Physiology*, 142(4), pp. 1603-1620. doi: 10.1104/pp.106.086231.
- Jones, L., Keining, T., Eamens, A. & Vaistij, F. E. (2006) «Virus-induced gene silencing of argonaute genes in *Nicotiana benthamiana* demonstrates that extensive systemic silencing requires Argonaute1-like and Argonaute4-like genes.», *Plant physiology*, 141(2), pp. 598-606. doi: 10.1104/pp.105.076109.
- Jones, N. (2002) «Somatic embryogenesis as a tool to capture genetic gain from tree breeding strategies: Risks and benefits», *The Southern African Forestry Journal*. Taylor & Francis Group, 195(1), pp. 93-101. doi: 10.1080/20702620.2002.10434610.
- Jung, J., Kim, M., Kim, M.-J., Kim, J., Moon, J., Lim, J.-S., Kim, M. & Lee, K. (2004) «Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the Third Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase α Subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells», *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), pp. 49868-49875. doi: 10.1074/jbc.M400895200.

Kadioglu, O. & Efferth, T. (2016) «Peptide aptamer identified by molecular docking targeting translationally controlled tumor protein in leukemia cells.», *Investigational new drugs*. doi: 10.1007/s10637-016-0339-6.

Kaldenhoff, R. & Richter, G. (1989) «Sequence of cDNA for a novel light-induced glycine-rich protein», *Nucleic Acids Research*, 17(7), p. 4767.

Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. L. (2004) «A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method», *Journal of Molecular Biology*, 338(5), pp. 1027-1036. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.016.

Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P. & Ahringer, J. (2003) «Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi.», *Nature*, 421(6920), pp. 231-7. doi: 10.1038/nature01278.

Kang, H. S., Lee, M. J., Song, H., Han, S. H., Kim, Y. M., Im, J. Y. & Choi, I. (2001) «Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor.», *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 166(11), pp. 6545-54. doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6545.

Kang, J.-G., Yun, J., Song, P.-S. & Park, C. (2003) «TRANSGENIC PLANT TRANSFORMED WITH A TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) GENE», 2(12), pp. 1-23.

Kanno, T., Huettel, B., Mette, M. F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D. P., Matzke, M. & Matzke, A. J. M. (2005) «Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation.», *Nature genetics*, 37(7), pp. 761-5. doi: 10.1038/ng1580.

Kapoor, M., Arora, R., Lama, T., Nijhawan, A., Khurana, J. P., Tyagi, A. K. & Kapoor, S. (2008) «Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice.», *BMC genomics*, 9, p. 451. doi: 10.1186/1471-2164-9-451.

Kar, B., Nayak, S. & Joshi, R. K. (2012) «Classification and comparative analysis of *Curcuma longa* L. expressed sequences tags (ESTs) encoding glycine-rich proteins (GRPs)», *Bioinformation*, 8(3), pp. 142-146. doi: 10.6026/97320630008142.

- Karami, O., Aghavaishi, B. & Mahmoudi Pour, A. (2009) «Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants.», *Journal of chemical biology*. Springer, 2(4), pp. 177-90. doi: 10.1007/s12154-009-0028-4.
- Kataoka, Y., Takeichi, M. & Uemura, T. (2001) «Developmental roles and molecular characterization of a *Drosophila* homologue of *Arabidopsis* Argonaute1, the founder of a novel gene superfamily.», *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6(4), pp. 313-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318874>.
- Keller, B. & Baumgartner, C. (1991) «Vascular-specific expression of the bean GRP 1.8 gene is negatively regulated.», *The Plant cell*, 3(10), pp. 1051-61. doi: 10.1105/tpc.3.10.1051.
- Kim, J. S. J. Y., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kim, J. S. J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C.-H. & Kang, H. (2007) «Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*.», *Nucleic acids research*, 35(2), pp. 506-16. doi: 10.1093/nar/gkl1076.
- Kim, J. S., Jung, H. J., Lee, H. J., Kim, K. A., Goh, C.-H., Woo, Y., Oh, S. H., Han, Y. S. & Kang, H. (2008) «Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 55(3), pp. 455-66. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03518.x.
- Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S. J., Goh, C.-H., Cho, K., Han, O. & Kang, H. (2007) «Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 50(3), pp. 439-51. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03057.x.
- Kim, M. J., Kwon, J. S., Suh, S. H., Suh, J. K., Jung, J., Lee, S. N., Kim, Y. H., Cho, M. C., Oh, G. T. & Lee, K. (2008) «Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na⁺,K⁺-ATPase», *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(1), pp. 151-159. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.09.017.
- Kim, M., Jung, J. & Lee, K. (2009) «Roles of ERK, PI3 kinase, and PLC-gamma pathways induced by overexpression of translationally controlled tumor protein in HeLa cells.», *Archives of biochemistry and biophysics*, 485(1), pp. 82-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388149>.
- Kim, M., Jung, Y., Lee, K. & Kim, C. (2000) «Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein.», *Archives of pharmacal research*, 23(6), pp. 633-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156187>.

- Kim, M., Kim, M., Kim, H. Y., Kim, S., Jung, J., Maeng, J., Chang, J. & Lee, K. (2011) «A protein transduction domain located at the NH₂-terminus of human translationally controlled tumor protein for delivery of active molecules to cells», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 32(1), pp. 222-230. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.077.
- Kim, Y.-M., Han, Y.-J., Hwang, O.-J., Lee, S.-S., Shin, A.-Y., Kim, S. Y. & Kim, J.-I. (2012) «Overexpression of *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure.», *Molecules and cells*, 33(6), pp. 617-26. doi: 10.1007/s10059-012-0080-8.
- Kim, Y.-O. & Kang, H. (2006) «The role of a zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein during the cold adaptation process in *Arabidopsis thaliana*.», *Plant & cell physiology*, 47(6), pp. 793-8. doi: 10.1093/pcp/pcj047.
- Kim, Y.-O., Kim, J. S. & Kang, H. (2005) «Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*.», *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 42(6), pp. 890-900. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02420.x.
- Kim, Y.-O., Pan, S., Jung, C.-H. & Kang, H. (2007) «A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, atRZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions.», *Plant & cell physiology*, 48(8), pp. 1170-81. doi: 10.1093/pcp/pcm087.
- Kleinschmit, J. (1993) «Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species», *Annales des sciences forestières*. EDP Sciences, 50(Supplement), p. 166s-185s. doi: 10.1051/forest:19930716.
- Kloosterman, B., Oortwijn, M., uitdeWilligen, J., America, T., de Vos, R., Visser, R. G. F. & Bachem, C. W. B. (2010) «From QTL to candidate gene: genetical genomics of simple and complex traits in potato using a pooling strategy.», *BMC genomics*, 11, p. 158. doi: 10.1186/1471-2164-11-158.
- Knapic, S., Louzada, J. L., Leal, S. & Pereira, H. (2008) «Within-tree and between-tree variation of wood density components in cork oak trees in two sites in Portugal», *Forestry*. Oxford University Press, 81(4), pp. 465-473. doi: 10.1093/forestry/cpn012.
- Kodama, H., Ito, M., Hattori, T., Nakamura, K. & Komamine, A. (1991) «Isolation of Genes that Are Preferentially Expressed at the G₁/S Boundary during the Cell Cycle in Synchronized Cultures of *Catharanthus roseus* Cells», *Plant physiology*, 95(2), pp. 406-411. doi: 10.1104/pp.95.2.406.

- Koide, Y., Kiyota, T., Tonganunt, M., Pinkaew, D., Liu, Z., Kato, Y., Hutadilok-Towatana, N., Phongdara, A. & Fujise, K. (2009) «Embryonic lethality of fortilin-null mutant mice by BMP-pathway overactivation.», *Biochimica et biophysica acta*, 1790(5), pp. 326-38. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.01.012.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007) «Enhancements and modifications of primer design program Primer3», *Bioinformatics*, 23(10), pp. 1289-1291. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091.
- Köster, T., Meyer, K., Weinholdt, C., Smith, L. M., Lummer, M., Speth, C., Grosse, I., Weigel, D. & Staiger, D. (2014) «Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in *Arabidopsis*.», *Nucleic acids research*, 42(15), pp. 9925-36. doi: 10.1093/nar/gku716.
- Koziol, M. J., Garrett, N. & Gurdon, J. B. (2007) «Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei.», *Current biology: CB*, 17(9), pp. 801-7. doi: 10.1016/j.cub.2007.03.062.
- Koziol, M. J. & Gurdon, J. B. (2012) «TCTP in development and cancer.», *Biochemistry research international*, 2012, p. 105203. doi: 10.1155/2012/105203.
- Kremer, A., Abbott, A. G., Carlson, J. E., Manos, P. S., Plomion, C., Sisco, P., Staton, M. E., Ueno, S. & Vendramin, G. G. (2012) «Genomics of Fagaceae», *Tree Genetics and Genomes*, 8(3), pp. 583-610. doi: 10.1007/s11295-012-0498-3.
- Kremer, A., Casasoli, M., Barreneche, T., Bodénès, C., Sisco, P., Kubisiak, T., Scalfi, M., Leonardi, S., Bakker, E., Buiteveld, J., Romero-Severson, J., Arumuganathan, K., Derory, J., Scotti-Saintagne, C., Roussel, G., Bertocchi, M., Lexer, C., Porth, I., Hebard, F., Clark, C., Carlson, J., Plomion, C., Koelewijn, H. & Villani, F. (2007) «Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants», *Springer, Heidelberg*, 7, pp. 165–187.
- Kremer, A. & Petit, R. (1993) «Gene diversity in natural populations of oak species», *Annales des sciences forestières*. EDP Sciences, 50(Supplement), p. 186s-202s. doi: 10.1051/forest:19930717.
- Kremer, A., Sederoff, R. & Wheeler, N. (2010) «Genomics of forest and ecosystem health in the Fagaceae: meeting report», *Tree Genetics & Genomes*. Springer-Verlag, 6(5), pp. 815-820. doi: 10.1007/s11295-010-0277-y.
- Kubisiak, T. L., Hebard, F. V., Nelson, C. D., Zhang, J., Bernatzky, R., Huang, H., Anagnostakis, S. L. & Doudrick, R. L. (1997) «Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific

cross in the genus *castanea*.», *Phytopathology*, 87(7), pp. 751-9. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.7.751.

Kuhn, C.-D. & Joshua-Tor, L. (2013) «Eukaryotic Argonautes come into focus.», *Trends in biochemical sciences*, 38(5), pp. 263-71. doi: 10.1016/j.tibs.2013.02.008.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) «MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets», *Molecular Biology and Evolution*. Oxford University Press, 33(7), pp. 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Kumar, V., Rout, S., Tak, M. K., Deepak, K. R., Env, N. & Tech, P. (2015) «Application of Biotechnology in Forestry : Current Status and Future Perspective Application of Biotechnology in Forestry : Current Status and Future Perspective», (October).

Kurczyńska, E. U., Gaj, M. D., Ujczak, A. & Mazur, E. (2007) «Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.», *Planta*, 226(3), pp. 619-28. doi: 10.1007/s00425-007-0510-6.

Kurihara, Y. & Watanabe, Y. (2004) «*Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), pp. 12753-8. doi: 10.1073/pnas.0403115101.

Kwak, K. J., Kim, Y. O. & Kang, H. (2005) «Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress.», *Journal of experimental botany*, 56(421), pp. 3007-16. doi: 10.1093/jxb/eri298.

Kwak, P. B. & Tomari, Y. (2012) «The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly.», *Nature structural & molecular biology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 19(2), pp. 145-51. doi: 10.1038/nsmb.2232.

Laberge, S., Castonguay, Y. & Vezina, L. P. (1993) «New cold- and drought- regulated gene from *Medicago sativa*», *Plant Physiology*, 101, pp. 1411-1412.

Langdon, J. M., Vonakis, B. M. & MacDonald, S. M. (2004) «Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta).», *Biochimica et biophysica acta*, 1688(3), pp. 232-6. doi: 10.1016/j.bbadis.2003.12.007.

- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U. & Flinn, B. S. (2012) «Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine», *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. Springer-Verlag, 48(3), pp. 341-354. doi: 10.1007/s11627-012-9440-5.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. . G., Feldmann, K. . A., Benfey, P. . N., Aeschbacher, R. ., Hauser, M.-T., Feldmann, K. . A., Benfey, P. . N., Bell, C. ., Ecker, J. ., Benfey, P. . N., Linstead, P. ., Roberts, K., Schiefelbein, J. ., Hauser, M.-T., Aeschbacher, R. ., Berry, J. ., Nikolau, B. ., Carr, J. ., Klessing, D. ., Coen, E. ., Romero, J. ., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., Carpenter, R., Desai, C., Garriga, G., McIntire, S., Horvitz, H. ., Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P. ., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B., Esau, K., Feldmann, K. . A., Freshour, G., Clay, R. ., Fuller, M. ., Albersheim, P., Darvill, A. ., Hahn, M. . G., Heidecker, G., Messing, J., Horvitz, H. ., Herskowitz, I. *et al.*, (1996) «The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root.», *Cell*. Elsevier, 86(3), pp. 423-33. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80115-4.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. & Jürgens, G. (1996) «The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*.», *Development* (Cambridge, England), 122(1), pp. 87-96. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565856>.
- Laux, T., Würschum, T. & Breuninger, H. (2004) «Genetic regulation of embryonic pattern formation.», *The Plant cell*, 16 Suppl, pp. S190-S202. doi: 10.1105/tpc.016014.
- Law, J. A. & Jacobsen, S. E. (2010) «Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.», *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 11(3), pp. 204-20. doi: 10.1038/nrg2719.
- Ledwoń, A. & Gaj, M. D. (2009) «LEAFY COTYLEDON2 gene expression and auxin treatment in relation to embryogenic capacity of *Arabidopsis* somatic cells.», *Plant cell reports*, 28(11), pp. 1677-88. doi: 10.1007/s00299-009-0767-2.
- Lee, B. H. & Amon, A. (2003) «Polo kinase--meiotic cell cycle coordinator.», *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 2(5), pp. 400-2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963824>.
- Lee, J.-Y. & Lee, D.-H. (2003) «Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress.», *Plant physiology*, 132(2), pp. 517-529. doi: 10.1104/pp.103.020511.
- Lee, S. A., Jang, S., Yoon, E. K., Heo, J.-O., Chang, K. S., Choi, J. W., Dhar, S., Kim, G., Choe, J.-E., Heo, J. B., Kwon, C., Ko, J.-H., Hwang, Y.-S., Lim, J., Abrash, E. B., Bergmann, D. C.,

Baum, S. F., Joseph, G. D., Thomas, L. R., Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T., Aeschbacher, R. A., Campilho, A., Garcia, B., Toorn, H. V., Wijk, H. V., Campilho, A., Scheres, B., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Blilou, I., Grieneisen, V. A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., al., et, Clough, S., Bent, A., Cui, H., Benfey, P. N., Cui, H., Benfey, P. N., Cui, H., Levesque, M. P., Vernoux, T., Jung, J. W., Paquette, A. J., Gallagher, K. L., Wang, J. Y., Blilou, I. *et al.*, (2016) «Interplay between ABA and GA Modulates the Timing of Asymmetric Cell Divisions in the *Arabidopsis* Root Ground Tissue», *Molecular Plant*. Elsevier, 9(6), pp. 870-884. doi: 10.1016/j.molp.2016.02.009.

Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J. & Carthew, R. W. (2004) «Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways.», *Cell*, 117(1), pp. 69-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066283>.

Legué, V., Rigal, A. & Bhalerao, R. P. (2014) «Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors.», *Physiologia plantarum*, 151(2), pp. 192-8. doi: 10.1111/ppl.12197.

Leljak-Levanić, D., Mihaljević, S. & Bauer, N. (2015) «Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis», *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(7), p. 127. doi: 10.1007/s11738-015-1875-y.

Lelu-Walter, M.-A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M. & Pâques, L. E. (2013) «Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction», *Tree Genetics & Genomes*. Springer Berlin Heidelberg, 9(4), pp. 883-899. doi: 10.1007/s11295-013-0620-1.

Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van De Peer, Y., Rouzé, P. & Rombauts, S. (2002) «PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences», *Nucleic Acids Research*, 30(1), pp. 325-327. doi: 10.1093/nar/30.1.325.

Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.-C., Vidal, M., Amson, R. & Telerman, A. (2008) «Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice.», *Cell death and differentiation*. Macmillan Publishers Limited, 15(11), pp. 1723-33. doi: 10.1038/cdd.2008.104.

- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. (2003) «Prediction of mammalian microRNA targets.», *Cell*, 115(7), pp. 787-98. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697198>.
- Li, C. F., Henderson, I. R., Song, L., Fedoroff, N., Lagrange, T. & Jacobsen, S. E. (2008) «Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*.», *PLoS genetics*, 4(2), p. e27. doi: 10.1371/journal.pgen.0040027.
- Li, D., Deng, Z., Liu, X. & Qin, B. (2013) «Molecular cloning, expression profiles and characterization of a novel translationally controlled tumor protein in rubber tree (*Hevea brasiliensis*).», *Journal of plant physiology*, 170(5), pp. 497-504. doi: 10.1016/j.jplph.2012.11.014.
- Li, F., Zhang, D. & Fujise, K. (2001) «Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein.», *The Journal of biological chemistry*, 276(50), pp. 47542-9. doi: 10.1074/jbc.M108954200.
- Li, G., Liu, X., Li, X. & Wang, Z. (2010) «Cloning of a TCTP gene in wheat and its expression induced by *Erysiphe graminis*», *Bulletin of Botanical Research*, 30(4), pp. 441-447.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., Zhang, F., Raikhel, N., Jiang, L. & Chen, X. (2013) «MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*.», *Cell. Elsevier*, 153(3), pp. 562-74. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.005.
- Li, S., Zhao, Y., Zhao, Z., Wu, X., Sun, L., Liu, Q. & Wu, Y. (2016) «Crystal Structure of the GRAS Domain of SCARECROW-LIKE7 in *Oryza sativa*.», *The Plant cell*, 28(5), pp. 1025-34. doi: 10.1105/tpc.16.00018.
- Liao, M., Li, Y. & Wang, Z. (2009) «Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach», *Proteomics*, 9(10), pp. 2809-2819. doi: 10.1002/pmic.200800192.
- Lilin, Z., Huijuan, C., Xiaodong, L., Fucheng, L., Xiaoxiao, F. & Jianping, L. (2013) «MoTCTP, A Homolog of Translationally Controlled Tumor Protein, Is Required for Fungal Growth and Conidiation in *Magnaporthe oryzae*.», 35(30971879), pp. 1-14. doi: 10.11844/cjcb.2013.08.0128.
- Lin, C.-H. & Chen, C.-Y. (2014) «Characterization of the Dual Subcellular Localization of Liliun LsGRP1, a Plant Class II Glycine-Rich Protein», *Phytopathology*, 104(10), pp. 1012-1020. doi: 10.1094/PHYTO-01-14-0020-R.

- Lin, C.-S., Lai, Y.-H., Sun, C.-W., Liu, N.-T., Tsay, H.-S., Chang, W.-C. & Chen, J. J. W. (2006) «Identification of ESTs differentially expressed in green and albino mutant bamboo (*Bambusa edulis*) by suppressive subtractive hybridization (SSH) and microarray analysis», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), pp. 169-175. doi: 10.1007/s11240-006-9105-3.
- Lin, X., Hwang, G. J. & Zimmerman, J. L. (1996) «Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos.», *Plant physiology. American Society of Plant Biologists*, 112(3), pp. 1365-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8938424>.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. (2003) «Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain.», *Nature*, 426(6965), pp. 465-9. doi: 10.1038/nature02123.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. (2004) «Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain.», *Nature structural & molecular biology*, 11(6), pp. 576-7. doi: 10.1038/nsmb777.
- Liu, B., Li, P., Li, X., Liu, C., Cao, S., Chu, C. & Cao, X. (2005) «Loss of function of OsDCL1 affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice.», *Plant physiology*, 139(1), pp. 296-305. doi: 10.1104/pp.105.063420.
- Liu, H., Peng, H.-W., Cheng, Y.-S., Yuan, H. S. & Yang-Yen, H.-F. (2005) «Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP.», *Molecular and cellular biology*, 25(8), pp. 3117-26. doi: 10.1128/MCB.25.8.3117-3126.2005.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L. & Hannon, G. J. (2004) «Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.», *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), pp. 1437-41. doi: 10.1126/science.1102513.
- Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D. P. & Wang, X. (2003) «R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway.», *Science (New York, N.Y.)*, 301(5641), pp. 1921-5. doi: 10.1126/science.1088710.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (2002) «Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA.», *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), pp. 2053-6. doi: 10.1126/science.1076311.
- Long, R., Yang, Q., Kang, J., Zhang, T., Wang, H., Li, M. & Zhang, Z. (2013) «Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in *Arabidopsis*.», *Plant cell reports*, 32(8), pp. 1289-98. doi: 10.1007/s00299-013-1443-0.

- Long, Y., Goedhart, J., Schneijderberg, M., Terpstra, I., Shimotohno, A., Bouchet, B. P., Akhmanova, A., Gadella, T. W. J., Heidstra, R., Scheres, B. & Blilou, I. (2015) «SCARECROW-LIKE23 and SCARECROW jointly specify endodermal cell fate but distinctly control SHORT-ROOT movement», *The Plant Journal*, 84(4), pp. 773-784. doi: 10.1111/tpj.13038.
- Lopez, a. P. & Franco, a. R. (2006) «Cloning and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein from strawberry fruits», *Biologia Plantarum*, 50(3), pp. 447-449. doi: 10.1007/s10535-006-0067-4.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. ., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. & Harada, J. J. (1998) «*Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells», *Cell*, 93(7), pp. 1195-1205. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81463-4.
- Lu, C., Wallis, J. G. & Browse, J. (2007) «An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library», *BMC Plant Biology*, 7(1), p. 42. doi: 10.1186/1471-2229-7-42.
- Lucibello, M., Gambacurta, A., Zonfrillo, M., Pierimarchi, P., Serafino, A., Rasi, G., Rubartelli, A. & Garaci, E. (2011) «TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress-induced cell-death.», *Experimental cell research*, 317(17), pp. 2479-89. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.012.
- Luo, M., Lihua, L., Hill, R. D. & Mohapatra, S. S. (1991) «Primary structure of an environmental stress and abscisic acid-inducible alfalfa protein», *Plant molecular biology*, pp. 1267-1269.
- Luo, Y. & Koop, H.-U. (1997) «Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes», *Planta*. Springer-Verlag, 202(3), pp. 387-396. doi: 10.1007/s004250050141.
- Lynn, K., Fernandez, a, Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P. & Barton, M. K. (1999) «The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene.», *Development (Cambridge, England)*, 126(3), pp. 469-481.
- Ma, J.-B., Ye, K. & Patel, D. J. (2004) «Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain.», *Nature*, 429(6989), pp. 318-22. doi: 10.1038/nature02519.

Ma, T., Wang, J., Zhou, G., Yue, Z., Hu, Q., Chen, Y., Liu, B., Qiu, Q., Wang, Z., Zhang, J., Wang, K., Jiang, D., Gou, C., Yu, L., Zhan, D., Zhou, R., Luo, W., Ma, H., Yang, Y., Pan, S., Fang, D., Luo, Y., Wang, X., Wang, G., Wang, J., Wang, Q., Lu, X., Chen, Z., Liu, J., Lu, Y., Yin, Y., Yang, H., Abbott, R. J., Wu, Y., Wan, D., Li, J., Yin, T., Lascoux, M., DiFazio, S. P., Tuskan, G. A., Wang, J. & Jianquan, L. (2013) «Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar», *Nature Communications*. *Nature Research*, 4. doi: 10.1038/ncomms3797.

Ma, Y.-P. & Zhu, W.-L. (2012) «Cytoplasmic and nuclear localization of TCTP in normal and cancer cells.», *Biochemistry research international*, 2012, p. 871728. doi: 10.1155/2012/871728.

Macdonald, S. M. (2012) «Histamine Releasing Factor / Translationally Controlled Tumor Protein : History , Functions and Clinical Implications», pp. 12-18.

MacDonald, S. M. (1996) «Histamine-releasing factors», *Current Opinion in Immunology*, 8(6), pp. 778-783. doi: 10.1016/S0952-7915(96)80004-5.

MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. a, Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., Langdon, J. M. & Meshnick, S. R. (2001) «Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp. 10829-10832. doi: 10.1073/pnas.201191498.

MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J. & Lichtenstein, L. M. (1995) «Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor.», *Science (New York, N.Y.)*, 269(5224), pp. 688-90. doi: 10.1126/science.7542803.

Magioli, C., Maria Barrôco, R., Rocha, C. A. B., Dolores De Santiago-Fernandes, L., Mansur, E., Engler, G., Margis-Pinheiro, M. & Sachetto-Martins, G. (2001) «Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (Atgrp-5)», *Plant Science*, 161(3), pp. 559-567.

Maheshwari, P. (Panchanan) 1904-1966 & Maheshwari, P. (Panchanan), 1904-1966 (1950) *An introduction to the embryology of angiosperms*. 1st ed. New York,: McGraw-Hill,. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/26581>.

Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J. & Verma, D. P. S. (2006) «*Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals.», *The Plant cell*, 18(2), pp. 477-90. doi: 10.1105/tpc.105.035931.

- Manavella, P. A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B. & Weigel, D. (2012) «Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1.», *Cell*, 151(4), pp. 859-70. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.039.
- Mangeon, A., Junqueira, R. M. & Sachetto-Martins, G. (2010) «Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily.», *Plant signaling & behavior*, 5(2), pp. 99-104. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mangeon, A., Magioli, C., Menezes-Salgueiro, A. D., Cardeal, V., de Oliveira, C., Galvão, V. C., Margis, R., Engler, G. & Sachetto-Martins, G. (2009) «AtGRP5, a vacuole-located glycine-rich protein involved in cell elongation.», *Planta*, 230(2), pp. 253-65. doi: 10.1007/s00425-009-0940-4.
- Mangeon, A., Pardal, R., Menezes-Salgueiro, A. D., Duarte, G. L., de Seixas, R., Cruz, F. P., Cardeal, V., Magioli, C., Ricachenevsky, F. K., Margis, R. & Sachetto-Martins, G. (2016) «AtGRP3 Is Implicated in Root Size and Aluminum Response Pathways in *Arabidopsis*.», *PloS one*, 11(3), p. e0150583. doi: 10.1371/journal.pone.0150583.
- Manos, P. S., Doyle, J. J. & Nixon, K. C. (1999) «Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae).», *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(3), pp. 333-49. doi: 10.1006/mpev.1999.0614.
- Manos, P. S. & Stanford, A. M. (2001) «The Historical Biogeography of Fagaceae: Tracking the Tertiary History of Temperate and Subtropical Forests of the Northern Hemisphere», *International Journal of Plant Sciences*, 162(S6), pp. S77-S93. doi: 10.1086/323280.
- Mansfield, S. G. & Briarty, L. G. (1991) «Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo», *Canadian Journal of Botany*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 69(3), pp. 461-476. doi: 10.1139/b91-063.
- Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Lohar, D. P., Sharopova, N., Saeed, N. A., Wang, X.-D., VandenBosch, K. A. & Rose, R. J. (2008) «The Transcription Factor MtSERF1 of the ERF Subfamily Identified by Transcriptional Profiling Is Required for Somatic Embryogenesis Induced by Auxin Plus Cytokinin in *Medicago truncatula*», *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(4), pp. 1622-1636. doi: 10.1104/pp.107.110379.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. & Bryant, S. H. (2005) «CDD: a Conserved Domain

Database for protein classification.», *Nucleic acids research*, 33(Database issue), pp. D192-6. doi: 10.1093/nar/gki069.

Martínez, T., Corredoira, E., Valladares, S., Jorquera, L. & Vieitez, A. M. (2008) «Germination and conversion of somatic embryos derived from mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 95(3), pp. 341-351. doi: 10.1007/s11240-008-9448-z.

Maximova, S. N., Florez, S., Shen, X., Niemenak, N., Zhang, Y., Curtis, W., Gultinan, M. J., Argout, X., Salse, J., Aury, J., Gultinan, M., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., Legavre, T., Maximova, S., Abrouk, M., Murat, F., Fouet, O., Poulain, J., Ruiz, M., Roguet, Y., Rodier-Goud, M., Barbosa-Neto, J., Sabot, F., Kudrna, D., Ammiraju, J., Schuster, S., Carlson, J., Sallet, E., Schiex, T., Dievart, A., Kramer, M., Gelley, L., Shi, Z., Bérard, A., Jenik, P., Gillmor, C., Lukowitz, W., Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., Leubner-Metzger, G., Esau, K., Braybrook, S., Harada, J., Spencer, M., Casson, S., Lindsey, K., Naik, S., Chand, P., Steward, F., Pollard, J., Patchett, A., Witkop, B., Zimmerman, J., Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F. *et al.*, (2014) «Genome-wide analysis reveals divergent patterns of gene expression during zygotic and somatic embryo maturation of *Theobroma cacao* L., the chocolate tree», *BMC Plant Biology*. BioMed Central, 14(1), p. 185. doi: 10.1186/1471-2229-14-185.

Mayer, U. & Jürgens, G. (1998) «Pattern formation in plant embryogenesis: A reassessment», *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 9(2), pp. 187-193. doi: 10.1006/scdb.1997.0210.

Mayfield, J. A. & Preuss, D. (2000) «Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17.», *Nature cell biology*, 2(2), pp. 128-130. doi: 10.1038/35000084.

Maynard, C. A., Powell, W. A., Polin-McGuigan, L. D., Viéitez, A. M., Ballester, A., Corredoira, E., Merkle, S. A. & Andrade, G. M. (2009) «Chestnut», en *Compendium of Transgenic Crop Plants*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781405181099.k0905.

Meister, G. (2013) «Argonaute proteins: functional insights and emerging roles.», *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 14(7), pp. 447-59. doi: 10.1038/nrg3462.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. & Tuschl, T. (2004) «Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs.», *Molecular cell*, 15(2), pp. 185-97. doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.007.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. & Robaglia, C. (2002) «Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene.»,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(9), pp. 6422-7. doi: 10.1073/pnas.092141899.

Merino, I., Abrahamsson, M., Sterck, L., Craven-Bartle, B., Canovas, F. & von Arnold, S. (2016) «Transcript profiling for early stages during embryo development in Scots pine», BMC Plant Biology, 16(1), p. 255. doi: 10.1186/s12870-016-0939-5.

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J. & Qi, Y. (2008) «Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide.», Cell, 133(1), pp. 116-27. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.034.

Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., Senin, P., Wang, W., Ly, B. V., Lewis, K. L. T., Salzberg, S. L., Feng, L., Jones, M. R., Skelton, R. L., Murray, J. E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R. E., Michael, T. P., Wall, K., Rice, D. W., Albert, H., Wang, M.-L., Zhu, Y. J., Schatz, M., Nagarajan, N., Acob, R. A., Guan, P., Blas, A., Wai, C. M., Ackerman, C. M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J.-K., Shakirov, E. V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J. E., Gschwend, A. R., Delcher, A. L., Singh, R., Suzuki, J. Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Pérez, R., Torres, M. J., Feltus, F. A., Porter, B., Li *et al.*, (2008) «The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus)», Nature. Nature Publishing Group, 452(7190), pp. 991-996. doi: 10.1038/nature06856.

Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.-Y. & Helariutta, Y. (2013) «Stem cell function during plant vascular development», The EMBO Journal, 32(2), pp. 178-193. doi: 10.1038/emboj.2012.301.

Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H. & Siomi, M. C. (2010) «A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*.», Nature structural & molecular biology. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 17(8), pp. 1024-6. doi: 10.1038/nsmb.1875.

Monteuuis, O. (2016) «Micropropagation and production of forest trees», Vegetative Propagation of Forest Trees, (1), pp. 32-55.

Montgomery, T. a., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J. C. (2008) «Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation», Cell, 133(1), pp. 128-141. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.033.

Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. & Vaucheret, H. (2002) «Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance.», *The Plant cell*, 14(3), pp. 629-39.

Disponibile

en:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Mosher, R. A., Schwach, F., Studholme, D. & Baulcombe, D. C. (2008) «PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp. 3145-50. doi: 10.1073/pnas.0709632105.

Mostek, A., Börner, A., Badowiec, A. & Weidner, S. (2015) «Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions.», *Journal of plant physiology*, 174, pp. 166-76. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.020.

Moubayidin, L., Salvi, E., Giustini, L., Terpstra, I., Heidstra, R., Costantino, P. & Sabatini, S. (2016) «A SCARECROW-based regulatory circuit controls *Arabidopsis thaliana* meristem size from the root endodermis», *Planta*, 243(5), pp. 1159-1168. doi: 10.1007/s00425-016-2471-0.

Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G. & Laux, T. (1998) «Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis.», *The EMBO journal*, 17(6), pp. 1799-809. doi: 10.1093/emboj/17.6.1799.

Mulenga, A. & Azad, A. F. (2005) «The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors.», *Experimental & applied acarology*, 37(3-4), pp. 215-29. doi: 10.1007/s10493-005-3261-8.

Myburg, A. A., Grattapaglia, D., Tuskan, G. A., Hellsten, U., Hayes, R. D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., Goodstein, D. M., Dubchak, I., Poliakov, A., Mizrachi, E., Kullán, A. R. K., Hussey, S. G., Pinard, D., van der Merwe, K., Singh, P., van Jaarsveld, I., Silva-Junior, O. B., Togawa, R. C., Pappas, M. R., Faria, D. A., Sansaloni, C. P., Petroli, C. D., Yang, X., Ranjan, P., Tschaplinski, T. J., Ye, C.-Y., Li, T., Sterck, L., Vanneste, K., Murat, F., Soler, M., Clemente, H. S., Saidi, N., Cassan-Wang, H., Dunand, C., Hefer, C. A., Bornberg-Bauer, E., Kersting, A. R., Vining, K., Amarasinghe, V., Ranik, M., Naithani, S., Elser, J., Boyd, A. E., Liston, A., Spatafora, J. W., Dharmawardhana, P., Raja, R., Sullivan, C., Romanel, E., Alves-Ferreira, M. *et al.*, (2014) «The genome of *Eucalyptus grandis*», *Nature*. *Nature Research*, 510(7505), p. 356. doi: 10.1038/nature13308.

- Nagano-Ito, M., Banba, A. & Ichikawa, S. (2009) «Functional cloning of genes that suppress oxidative stress-induced cell death: TCTP prevents hydrogen peroxide-induced cell death.», *FEBS letters*, 583(8), pp. 1363-7. doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.045.
- Nagano-Ito, M. & Ichikawa, S. (2012) «Biological effects of mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis», *Biochemistry Research International*, 2012. doi: 10.1155/2012/204960.
- Nagasaki, H., Itoh, J., Hayashi, K., Hibara, K., Satoh-Nagasawa, N., Nosaka, M., Mukouhata, M., Ashikari, M., Kitano, H., Matsuoka, M., Nagato, Y. & Sato, Y. (2007) «The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), pp. 14867-71. doi: 10.1073/pnas.0704339104.
- Nakaminami, K., Hill, K., Perry, S. E., Sentoku, N., Long, J. A. & Karlson, D. T. (2009) «*Arabidopsis* cold shock domain proteins: relationships to floral and silique development.», *Journal of experimental botany*. Oxford University Press, 60(3), pp. 1047-62. doi: 10.1093/jxb/ern351.
- Nakanishi, K., Ascano, M., Gogakos, T., Ishibe-Murakami, S., Serganov, A. A., Briskin, D., Morozov, P., Tuschl, T. & Patel, D. J. (2013) «Eukaryote-Specific Insertion Elements Control Human ARGONAUTE Slicer Activity», *Cell Reports*. The Authors, 3(6), pp. 1893-1900. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.010.
- Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P. & Patel, D. J. (2012) «Structure of yeast Argonaute with guide RNA.», *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 486(7403), pp. 368-74. doi: 10.1038/nature11211.
- Nakkaew, A., Chotigeat, W. & Phongdara, A. (2010) «Molecular cloning and expression of EgTCTP , encoding a calcium binding protein , enhances the growth of callus in oil palm (*Elaeis guineensis* , Jacq)», *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32(6), pp. 561-569.
- Namasivayam, P. (2007) «Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1), pp. 1-8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9.
- Neale, D. B. & Kremer, A. (2011) «Forest tree genomics: growing resources and applications», *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 111-122. doi: 10.1038/nrg2931.

Neale, D. B., Wegrzyn, J. L., Stevens, K. A., Zimin, A. V, Puiu, D., Crepeau, M. W., Cardeno, C., Koriabine, M., Holtz-Morris, A. E., Liechty, J. D., Martínez-García, P. J., Vasquez-Gross, H. A., Lin, B. Y., Zieve, J. J., Dougherty, W. M., Fuentes-Soriano, S., Wu, L.-S., Gilbert, D., Marçais, G., Roberts, M., Holt, C., Yandell, M., Davis, J. M., Smith, K. E., Dean, J. F., Lorenz, W., Whetten, R. W., Sederoff, R., Wheeler, N., McGuire, P. E., Main, D., Loopstra, C. A., Mockaitis, K., deJong, P. J., Yorke, J. A., Salzberg, S. L., Langley, C. H., Farjon, A., Farjon, A., Leslie, A., Beaulieu, J., Rai, H., Crane, P., Donoghue, M., Mathews, S., Martínez-García, P., Stevens, K., Wegrzyn, J., Liechty, J., Crepeau, M., Langley, C., Neale, D., Zapata-Valenzuela, J., Isik, F., Maltecca, C., Wegrzyn, J. *et al.*, (2014) «Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies», *Genome Biology*. BioMed Central, 15(3), p. R59. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r59.

Nielsen, H. V, Johnsen, A. H., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F. & Schiotz, P. O. (1998) «Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor», *Allergy*, 53(7), pp. 642-652. doi: DOI 10.1111/j.1398-9995.1998.tb03950.x.

Nonomura, K.-I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H. & Kurata, N. (2007) «A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice.», *The Plant cell*, 19(8), pp. 2583-94. doi: 10.1105/tpc.107.053199.

Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J. & Yang, W. (2005) «Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis.», *Cell*, 121(7), pp. 1005-16. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.024.

Nystedt, B., Street, N. R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D. G., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E., Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hällman, J., Keech, O., Klasson, L., Koriabine, M., Kucukoglu, M., Käller, M., Luthman, J., Lysholm, F., Niittylä, T., Olson, Å., Rilakovic, N., Ritland, C., Rosselló, J. A., Sena, J., Svensson, T., Talavera-López, C., Theißen, G., Tuominen, H., Vanneste, K., Wu, Z.-Q., Zhang, B., Zerbe, P., Arvestad, L., Bhalerao, R., Bohlmann, J., Bousquet, J., Garcia Gil, R., Hvidsten, T. R., de Jong, P., MacKay, J., Morgante, M., Ritland, K., Sundberg, B., Lee Thompson, S., Van de Peer, Y., Andersson, B., Nilsson, O., Ingvarsson, P. K., Lundeberg, J. & Jansson, S. (2013) «The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution», *Nature*. Nature Research, 497(7451), pp. 579-584. doi: 10.1038/nature12211.

Oh, S.-H. & Manos, P. S. (2008) «Molecular phylogenetics and cupule evolution in Fagaceae as inferred from nuclear CRABS CLAW sequences», *Taxon*, 57(2).

- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K. & Kuroda, M. (2002) «Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor.», *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), pp. 984-7. doi: 10.1006/bbrc.2001.6302.
- Onodera, Y., Haag, J. R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O. & Pikaard, C. S. (2005) «Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation.», *Cell*, 120(5), pp. 613-22. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.007.
- El Ouakfaoui, S., Schnell, J., Abdeen, A., Colville, A., Labbé, H., Han, S., Baum, B., Laberge, S. & Miki, B. (2010) «Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors», *Plant Molecular Biology*, 74(4-5), pp. 313-326. doi: 10.1007/s11103-010-9674-8.
- Pacurar, D. I., Perrone, I. & Bellini, C. (2014) «Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting.», *Physiologia plantarum*, 151(1), pp. 83-96. doi: 10.1111/ppl.12171.
- Parent, G. J., Raherison, E., Sena, J. & MacKay, J. J. (2015) «Chapter Two – Forest Tree Genomics: Review of Progress», *Advances in Botanical Research*, 74, pp. 39-92. doi: 10.1016/bs.abr.2015.05.004.
- Park, A. R., Cho, S. K., Yun, U. J., Jin, M. Y., Lee, S. H., Sachetto-Martins, G. & Park, O. K. (2001) «Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3.», *The Journal of biological chemistry*, 276(28), pp. 26688-93. doi: 10.1074/jbc.M101283200.
- Park, C. J., Park, C. B., Hong, S. S., Lee, H. S., Lee, S. Y. & Kim, S. C. (2000) «Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*.», *Plant molecular biology*, 44(2), pp. 187-97. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117262>.
- Park, S. J., Kwak, K. J., Oh, T. R., Kim, Y. O. & Kang, H. (2009) «Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions.», *Plant & cell physiology*, 50(4), pp. 869-78. doi: 10.1093/pcp/pcp037.
- Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D. (2005) «Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex.», *Nature*, 434(7033), pp. 663-6. doi: 10.1038/nature03462.

Pauluzzi, G., Divol, F., Puig, J., Guiderdoni, E., Dievart, A. & Périn, C. (2012) «Surfing along the root ground tissue gene network», *Developmental Biology*, 365(1), pp. 14-22. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.007.

Pawlowski, K., Twigg, P., Dobritsa, S., Guan, C. & Mullin, B. C. (1997) «A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development.», *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 10(5), pp. 656-64. doi: 10.1094/MPMI.1997.10.5.656.

Pay, A., Heberle-bors, E., Hirt, H., We, J. G. & Hrzenjak, Z. (1992) «Sequence An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein species was found to occur largely as untrans- sequence was isolated from a cDNA library de- erable homology to these proteins . The alfalfa prepare», pp. 501-503.

Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P. & Harberd, N. P. (1997) «The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses.», *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(23), pp. 3194-205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389651>.

Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L. & Poethig, R. S. (2004) «SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*.», *Genes & development*, 18(19), pp. 2368-79. doi: 10.1101/gad.1231804.

Perazzolli, M., Bampi, F., Faccin, S., Moser, M., Luca, F. De, Ciccotti, A. M., Velasco, R., Gessler, C., Pertot, I. & Moser, C. (2010) «*Armillaria mellea* Induces a Set of Defense Genes in Grapevine Roots and One of Them Codifies a Protein with Antifungal Activity», 23(4), pp. 485-496.

Pereira, M. R., Gouvêa, B. C., Marcelino-Guimarães, F. C., Ramos, H. J. de O., Moreira, M. A. & Barros, E. G. de (2013) «Proteomic Analysis of Soybean Leaves in a Compatible and an Incompatible Interaction with *Phakopsora pachyrhizi*», *Organelles Proteomics*, 1(1), pp. 16-27. doi: 10.2478/orpr-2013-0004.

Pérez, S., Ahmed, A. I. S. & Cabezas, D. (2013) «Molecular and biochemical characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants cv. Micro-Tom under lead (Pb)-induced stress», *Biotecnologia Aplicada*, 30(3), pp. 194-198. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.urlid=2-s2.0-84884198092&partnerID=40&md5=2f6604ef33cf88ab19b1885569f09ed3>.

- Peters, L. & Meister, G. (2007) «Argonaute proteins: mediators of RNA silencing.», *Molecular cell*, 26(5), pp. 611-23. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.001.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011) «SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions», *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 8(10), pp. 785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701.
- Petit, R. J., Carlson, J., Curtu, A. L., Loustau, M.-L., Plomion, C., González-Rodríguez, A., Sork, V. & Ducousso, A. (2013) «Fagaceae trees as models to integrate ecology, evolution and genomics», *New Phytologist*, 197(2), pp. 369-371. doi: 10.1111/nph.12089.
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. (2004) «A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*.», *Cell*, 117(1), pp. 83-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066284>.
- Pijut, P. M., Woeste, K. E. & Michler, C. H. (2011) «Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species».
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. & Filipowicz, W. (2005) «Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells.», *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 309(5740), pp. 1573-6. doi: 10.1126/science.1115079.
- Plomion, C., Aury, J. M., Amselem, J., Alaeitabar, T., Barbe, V., Belser, C., Bergs, H., Bodns, C., Boudet, N., Boury, C., Canaguier, A., Couloux, A., Da Silva, C., Duplessis, S., Ehrenmann, F., Estrada-Mairey, B., Fouteau, S., Francillonne, N., Gaspin, C., Guichard, C., Klopp, C., Labadie, K., Lalanne, C., Le Clainche, I., Lepl, J. C., Le Provost, G., Leroy, T., Lesur, I., Martin, F., Mercier, J., Michotey, C., Murat, F., Salin, F., Steinbach, D., Faivre-Rampant, P., Wincker, P., Salse, J., Quesneville, H. & Kremer, A. (2016) «Decoding the oak genome: Public release of sequence data, assembly, annotation and publication strategies», *Molecular Ecology Resources*, 16(1), pp. 254-265. doi: 10.1111/1755-0998.12425.
- Plomion, C., Bastien, C., Bogeat-Triboulot, M. B., Bouffier, L., Déjardin, A., Duplessis, S., Fady, B., Heuertz, M., Le Gac, A. L., Le Provost, G., Legué, V., Lelu-Walter, M. A., Leplé, J. C., Maury, S., Morel, A., Oddou-Muratorio, S., Pilate, G., Sanchez, L., Scotti, I., Scotti-Saintagne, C., Segura, V., Trontin, J. F. & Vacher, C. (2016) «Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects», *Annals of Forest Science*, 73(1), pp. 77-103. doi: 10.1007/s13595-015-0488-3.

- Pontes, O., Li, C. F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S. E. & Pikaard, C. S. (2006) «The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center.», *Cell*, 126(1), pp. 79-92. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.031.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.-A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. & Lagrange, T. (2005) «Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*.», *Genes & development*, 19(17), pp. 2030-40. doi: 10.1101/gad.348405.
- Poulsen, C., Vaucheret, H. & Brodersen, P. (2013) «Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic argonaute structures.», *The Plant cell*, 25(1), pp. 22-37. doi: 10.1105/tpc.112.105643.
- Qi, Y., Denli, A. M. & Hannon, G. J. (2005) «Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways.», *Molecular cell*, 19(3), pp. 421-8. doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.014.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. & Hannon, G. J. (2006) «Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation.», *Nature*, 443(7114), pp. 1008-12. doi: 10.1038/nature05198.
- Qian, Y., Cheng, Y., Cheng, X., Jiang, H., Zhu, S. & Cheng, B. (2011) «Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize.», *Plant cell reports*, 30(7), pp. 1347-63. doi: 10.1007/s00299-011-1046-6.
- Qin, X., Gao, F., Zhang, J., Gao, J., Lin, S., Wang, Y., Jiang, L., Liao, Y., Wang, L., Jia, Y., Tang, L., Xu, Y. & Chen, F. (2011) «Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L.», *Molecular biology reports*, 38(5), pp. 3107-12. doi: 10.1007/s11033-010-9980-x.
- Qu, F., Ye, X. & Morris, T. J. (2008) «*Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), pp. 14732-14737. doi: 10.1073/pnas.0805760105.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M. & Loyola-Vargas, V. M. (2006) «Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 86(3), pp. 285-301. doi: 10.1007/s11240-006-9139-6.
- Radoeva, T. & Weijers, D. (2014) «A roadmap to embryo identity in plants», *Trends in Plant Science*, 19(11), pp. 709-716. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.009.

- Rao, K. V. N., Chen, L., Gnanasekar, M. & Ramaswamy, K. (2002) «Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*.», *The Journal of biological chemistry*, 277(34), pp. 31207-13. doi: 10.1074/jbc.M204114200.
- Reinert, J. (1959) «Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten», *Planta*. Springer-Verlag, 53(4), pp. 318-333. doi: 10.1007/BF01881795.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. & Bartel, D. P. (2002) «MicroRNAs in plants.», *Genes & development*, 16(13), pp. 1616-26. doi: 10.1101/gad.1004402.
- Repo, T., Mononen, K., Alvilä, L., Pakkanen, T. T. & Hänninen, H. (2008) «Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range», *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), pp. 59-70. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.10.023.
- Rho, S. B., Lee, J. H., Park, M. S., Byun, H.-J., Kang, S., Seo, S.-S., Kim, J.-Y. & Park, S.-Y. (2011) «Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53.», *FEBS letters*, 585(1), pp. 29-35. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.014.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. & Bartel, D. P. (2002) «Prediction of plant microRNA targets.», *Cell*, 110(4), pp. 513-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202040>.
- Rid, R., Onder, K., Trost, A., Bauer, J., Hintner, H., Ritter, M., Jakab, M., Costa, I., Reischl, W., Richter, K., MacDonald, S., Jendrach, M., Bereiter-Hahn, J. & Breitenbach, M. (2010) «H₂O₂-dependent translocation of TCTP into the nucleus enables its interaction with VDR in human keratinocytes: TCTP as a further module in calcitriol signalling.», *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 118(1-2), pp. 29-40. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.09.015.
- Ringli, C., Hauf, G. & Keller, B. (2001) «Hydrophobic interactions of the structural protein GRP1.8 in the cell wall of protoxylem elements.», *Plant physiology*, 125(2), pp. 673-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161025>.
- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J.-J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. (2005) «Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC.», *Nature structural & molecular biology*, 12(4), pp. 340-9. doi: 10.1038/nsmb918.
- Rodríguez-Medina, C., Atkins, C. a, Mann, A. J., Jordan, M. E. & Smith, P. M. (2011) «Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.).», *BMC plant biology*, 11(1), p. 36. doi: 10.1186/1471-2229-11-36.

Rogers, K. & Chen, X. (2013) «Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs.», *The Plant cell*, 25(7), pp. 2383-99. doi: 10.1105/tpc.113.113159.

Röhl, A., Rohrberg, J. & Buchner, J. (2013) «The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients.», *Trends in biochemical sciences*, 38(5), pp. 253-62. doi: 10.1016/j.tibs.2013.02.003.

Le Roux, J. J. & Staden, J. V (1991) «Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus-a review.», *Tree physiology*, 9(4), pp. 435-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972839>.

Della Rovere, F., Fattorini, L., Ronzan, M., Falasca, G. & Altamura, M. M. (2016) «The quiescent center and the stem cell niche in the adventitious roots of *Arabidopsis thaliana*», *Plant Signaling & Behavior*, 11(5), p. e1176660. doi: 10.1080/15592324.2016.1176660.

Rual, J.-F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A., Hirozane-kishikawa, T., Vandenhoute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., Van den Heuvel, S. & Vidal, M. (2004) «Toward Improving *Caenorhabditis elegans* Phenome Mapping With an ORFeome-Based RNAi Library», *Genome Research*, pp. 2162-2168. doi: 10.1101/gr.2505604.7.

De Rybel, B., Breda, A. S. & Weijers, D. (2014) «Prenatal plumbing-vascular tissue formation in the plant embryo», *Physiologia Plantarum*, 151(2), pp. 126-133. doi: 10.1111/pp1.12091.

Ryser, U. & Keller, B. (1992) «Ultrastructural Localization of a Bean Glycine-Rich Protein in Unlignified Primary Walls of Protoxylem Cells.», *The Plant cell*, 4(7), pp. 773-783. doi: 10.1105/tpc.4.7.773.

Ryser, U., Schorderet, M., Guyot, R. & Keller, B. (2004) «A new structural element containing glycine-rich proteins and rhamnogalacturonan I in the protoxylem of seed plants.», *Journal of cell science*, 117(Pt 7), pp. 1179-90. doi: 10.1242/jcs.00966.

Ryser, U., Schorderet, M., Zhao, G. F., Studer, D., Ruel, K., Hauf, G. & Keller, B. (1997) «Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 12(1), pp. 97-111. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9263454>.

Sabatini, D. M. (2006) «mTOR and cancer: insights into a complex relationship.», *Nature reviews. Cancer*, 6(9), pp. 729-34. doi: 10.1038/nrc1974.

- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M. & Scheres, B. (2003) «SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem.», *Genes & development*, 17(3), pp. 354-8. doi: 10.1101/gad.252503.
- Sachetto-Martins, G. (1995) «ACTIVITY OF A GLYCINE-RICH PROTEIN FROM PREFERENTIAL IN PROTODERM-DERIVED», *International Journal of Plant Sciences*, 156(4), pp. 460-470.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L. O. & de Oliveira, D. E. (2000) «Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif», *Biochimica et biophysica acta*, 1492(1), pp. 1-14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858526>.
- Sage-Ono, K. & Ono, M. (1998) «Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*», *Plant and cell ...*, 39(3), pp. 357-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588028> <http://pcp.oxfordjournals.org/content/39/3/357.short>.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) «The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.», *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp. 406-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3447015>.
- Sánchez, C., Vielba, J. M., Ferro, E., Covelo, G., Solé, A., Abarca, D., de Mier, B. S. & Díaz-Sala, C. (2007) «Two SCARECROW-LIKE genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species.», *Tree physiology*, 27(10), pp. 1459-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17669736>.
- Sanchez, J. C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M. R., James, R., Deshusses, J. & Hochstrasser, D. (1997) «Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes.», *Electrophoresis*, 18(1), pp. 150-5. doi: 10.1002/elps.1150180127.
- Sánchez, M. C. & Vieitez, A. M. (1991) «In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut.», *Tree physiology*, 8(1), pp. 59-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972897>.
- Sannigrahi, P., Ragauskas, A. J. & Tuskan, G. A. (2010) «Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics», *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. John Wiley & Sons, Ltd., 4(2), pp. 209-226. doi: 10.1002/bbb.206.

- Santa Brígida, A. B., dos Reis, S. P., Costa, C. D. N. M., Cardoso, C. M. Y., Lima, A. M. & de Souza, C. R. B. (2014) «Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response.», *Molecular biology reports*, 41(3), pp. 1787-97. doi: 10.1007/s11033-014-3028-6.
- Santos, A. M., Oliver, M. J., Snchez, A. M., Payton, P. R., Gomes, J. P., Miguel, C. & Oliveira, M. M. (2009) «An integrated strategy to identify key genes in almond adventitious shoot regeneration», *Journal of Experimental Botany*, 60(14), pp. 4159-4173. doi: 10.1093/jxb/erp250.
- Sasaki, K., Kim, M.-H. & Imai, R. (2007) «*Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals.», *Biochemical and biophysical research communications*, 364(3), pp. 633-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.059.
- Sato, S., Hirakawa, H., Isobe, S., Fukai, E., Watanabe, A., Kato, M., Kawashima, K., Minami, C., Muraki, A., Nakazaki, N., Takahashi, C., Nakayama, S., Kishida, Y., Kohara, M., Yamada, M., Tsuruoka, H., Sasamoto, S., Tabata, S., Aizu, T., Toyoda, A., Shin-i, T., Minakuchi, Y., Kohara, Y., Fujiyama, A., Tsuchimoto, S., Kajiyama, S., Makigano, E., Ohmido, N., Shibagaki, N., Cartagena, J. A., Wada, N., Kohinata, T., Atefeh, A., Yuasa, S., Matsunaga, S. & Fukui, K. (2011) «Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L.», *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. Oxford University Press, 18(1), pp. 65-76. doi: 10.1093/dnares/dsq030.
- Sato, S., Toya, T., Kawahara, R., Whittier, R. F., Fukuda, H. & Komamine, a (1995) «Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis.», *Plant molecular biology*, 28(1), pp. 39-46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7787186>.
- Scalfi, M., Troggio, M., Piovani, P., Leonardi, S., Magnaschi, G., Vendramin, G. G. & Menozzi, P. (2004) «A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.).», *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 108(3), pp. 433-41. doi: 10.1007/s00122-003-1461-3.
- Schirle, N. T. & MacRae, I. J. (2012) «The Crystal Structure of Human Argonaute2», *Science*, 336(6084), pp. 1037-1040. doi: 10.1126/science.1221551.
- Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J., Chandradoss, S. D., Joo, C. & MacRae, I. J. (2015) «Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets», *eLife*, 4(September), pp. 1-16. doi: 10.7554/eLife.07646.
- Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J. & MacRae, I. J. (2014) «Structural basis for microRNA targeting», *Science*, 346(6209), pp. 608-613. doi: 10.1126/science.1258040.

- Schlögl, P. S., dos Santos, A. L. W., do Nascimento Vieira, L., Floh, E. I. S. & Guerra, M. P. (2012) «Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze)», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 108(1), pp. 173-180. doi: 10.1007/s11240-011-0023-7.
- Schlögl, P. S., dos Santos, A. L. W., Vieira, L. do N., Floh, E. I. S. & Guerra, M. P. (2012) «Cloning and expression of embryogenesis-regulating genes in *araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Brazilian pine)», *Genetics and Molecular Biology*, 35(1), pp. 172-181. doi: 10.1590/S1415-47572012005000005.
- Scholthof, H. B., Alvarado, V. Y., Vega-Arreguin, J. C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A. & Moffett, P. (2011) «Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*.», *Plant physiology*, 156(3), pp. 1548-55. doi: 10.1104/pp.111.178764.
- Schöning, J. C., Streitner, C., Meyer, I. M., Gao, Y. & Staiger, D. (2008) «Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*.», *Nucleic acids research*, 36(22), pp. 6977-87. doi: 10.1093/nar/gkn847.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. ., Jürgens, G. & Laux, T. (2000) «The Stem Cell Population of *Arabidopsis* Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* Genes», *Cell*, 100(6), pp. 635-644. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80700-X.
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M. & Sandberg, G. (2004) «A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity.», *The Plant cell*, 16(9), pp. 2278-92. doi: 10.1105/tpc.104.024190.
- Schroeder, J. T., Lichtenstein, L. M. & MacDonald, S. M. (1996) «An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils.», *The Journal of experimental medicine*, 183(3), pp. 1265-70. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192336&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schroeder, J. T., Lichtenstein, L. M. & MacDonald, S. M. (1997) «Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils.», *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 159(1), pp. 447-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200485>.

Schuetz, M., Smith, R. & Ellis, B. (2012) «Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms», *Journal of Experimental Botany*, 64(1), pp. 11-31. doi: 10.1093/jxb/ers287.

Seo, E.-J. & Efferth, T. (2016) «Interaction of antihistaminic drugs with human translationally controlled tumor protein (TCTP) as novel approach for differentiation therapy», *Oncotarget. Impact Journals*, pp. 16818-16839. Disponible en: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%255B%255D=7605&path%255B%255D=22014>.

Shen, H.-B. & Chou, K.-C. (2006) «Ensemble classifier for protein fold pattern recognition.», *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(14), pp. 1717-22. doi: 10.1093/bioinformatics/btl170.

Shi, X., Zhang, C., Liu, Q., Zhang, Z., Zheng, B. & Bao, M. (2016) «De novo comparative transcriptome analysis provides new insights into sucrose induced somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.)», *BMC genomics. BMC Genomics*, 17(1), p. 26. doi: 10.1186/s12864-015-2357-8.

Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuče, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. & Xenarios, I. (2012) «New and continuing developments at PROSITE», *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 1-4. doi: 10.1093/nar/gks1067.

Sigrist, C. J. a, Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. & Bucher, P. (2002) «PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors.», *Briefings in bioinformatics*, 3(3), pp. 265-274. doi: 10.1093/bib/3.3.265.

Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N. & Sun, T. (1998) «The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway.», *The Plant cell*, 10(2), pp. 155-69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490740>.

Singh, R. K., Gase, K., Baldwin, I. T. & Pandey, S. P. (2015) «Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants», *BMC Plant Biology*, 15(1), p. 23. doi: 10.1186/s12870-014-0364-6.

Smertenko, A. & Bozhkov, P. V. (2014) «Somatic embryogenesis: Life and death processes during apical-basal patterning», *Journal of Experimental Botany*, 65(5), pp. 1343-1360. doi: 10.1093/jxb/eru005.

De Smet, I., Lau, S., Mayer, U. & Jürgens, G. (2010) «Embryogenesis - the humble beginnings of plant life», *The Plant Journal. Blackwell Publishing Ltd*, 61(6), pp. 959-970. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04143.x.

- Smolka, A., Welander, M., Olsson, P., Holefors, A. & Zhu, L.-H. (2009) «Involvement of the ARRO-1 gene in adventitious root formation in apple», *Plant Science*, 177(6), pp. 710-715. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.09.009.
- Solé, A., Sánchez, C., Vielba, J. M., Valladares, S., Abarca, D. & Díaz-Sala, C. (2008) «Characterization and expression of a *Pinus radiata* putative ortholog to the *Arabidopsis* SHORT-ROOT gene.», *Tree physiology*, 28(11), pp. 1629-39. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765368>.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. (2003) «The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes.», *Nature structural biology*, 10(12), pp. 1026-32. doi: 10.1038/nsb1016.
- Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. (2004) «Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity», *Science*, 305(5689), pp. 1434-1437. doi: 10.1126/science.1102514.
- Sönnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.-M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Röder, M., Finell, J., Häntsch, H., Jones, S. J. M., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A. A. & Echeverri, C. J. (2005) «Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*.», *Nature*, 434(7032), pp. 462-9. doi: 10.1038/nature03353.
- Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. & Bellini, C. (2005) «Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1.», *The Plant cell. American Society of Plant Biologists*, 17(5), pp. 1343-59. doi: 10.1105/tpc.105.031625.
- Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C. & Robaglia, C. (2007) «*Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility.», *BMC plant biology*, 7, p. 26. doi: 10.1186/1471-2229-7-26.
- de Souza, C. R. B., Carvalho, L. J. C. B. & de Mattos Cascardo, J. C. (2004) «Comparative gene expression study to identify genes possibly related to storage root formation in cassava.», *Protein and peptide letters*, 11(6), pp. 577-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579128>.

- Sprunck, S., Baumann, U., Edwards, K., Langridge, P. & Dresselhaus, T. (2005) «The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.)», *Plant Journal*, 41(5), pp. 660-672. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02332.x.
- Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, E. D. J., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Angenent, G., Scorza, R., Custers, J. B. M. & Boutilier, K. (2006) «Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)», *Planta*, 225(2), pp. 341-351. doi: 10.1007/s00425-006-0358-1.
- Stafstrom, J. P., Ripley, B. D., Devitt, M. L. & Drake, B. (1998) «Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2», *Planta*, 205(4), pp. 547-552. doi: 10.1007/s004250050354.
- Stasolla, C., van Zyl, L., Egertsdotter, U., Craig, D., Liu, W. & Sederoff, R. R. (2003) «The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos.», *Plant physiology*, 131(1), pp. 49-60. doi: 10.1104/pp.015214.
- Staton, M., Zhebentyayeva, T., Olukolu, B., Fang, G. C., Nelson, D., Carlson, J. E. & Abbott, A. G. (2015) «Substantial genome synteny preservation among woody angiosperm species: comparative genomics of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) and plant reference genomes.», *BMC genomics*, 16, p. 744. doi: 10.1186/s12864-015-1942-1.
- Steward, F. C. (1958) «Growth and Organized Development of Cultured Cells. III. Interpretations of the Growth from Free Cell to Carrot Plant», *American Journal of Botany*, 45(10), p. 709. doi: 10.2307/2439729.
- Stival Sena, J., Giguère, I., Boyle, B., Rigault, P., Birol, I., Zuccolo, A., Ritland, K., Ritland, C., Bohlmann, J., Jones, S., Bousquet, J., Mackay, J., Lynch, M., Conery, J., Deutsch, M., Long, M., Comeron, J., Kreitman, M., Castillo-Davis, C., Mekhedov, S., Hartl, D., Koonin, E., Kondrashov, F., Murray, B., Leitch, I., Bennett, M., Morse, A., Peterson, D., Islam-Faridi, M., Smith, K., Magbanua, Z., Garcia, S., Kubisiak, T., Amerson, H., Carlson, J., Nelson, C., Davis, J., Magbanua, Z., Ozkan, S., Bartlett, B., Chouvarine, P., Saski, C., Liston, A., Cronn, R., Nelson, C., Peterson, D., Pavy, N., Pelgas, B., Laroche, J., Rigault, P., Isabel, N., Bousquet, J., Nystedt, B., Street, N., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.-C., Scofield, D., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S. *et al.*, (2014) «Evolution of gene structure in the conifer *Picea glauca*: a comparative analysis of the impact of intron size», *BMC Plant Biology*. BioMed Central, 14(1), p. 95. doi: 10.1186/1471-2229-14-95.
- Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. & Harada, J. J. (2001) «LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor

that induces embryo development.», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, 98(20), pp. 11806-11. doi: 10.1073/pnas.201413498.

Streitner, C., Danisman, S., Wehrle, F., Schöning, J. C., Alfano, J. R. & Staiger, D. (2008) «The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*.», The Plant journal: for cell and molecular biology, 56(2), pp. 239-50. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03591.x.

Stürzenbaum, S. R., Kille, P. & Morgan, A. J. (1998) «Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*1.», Biochimica et biophysica acta, 1398(3), pp. 294-304. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655922>.

Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D. & Zhang, X. S. (2009) «Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*.», The Plant journal: for cell and molecular biology, 59(3), pp. 448-60. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03880.x.

Sun, X., Jones, W. T. & Rikkerink, E. H. a (2012) «GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling.», The Biochemical journal, 442(1), pp. 1-12. doi: 10.1042/BJ20111766.

Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, a, Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, a R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J.-C., Martinou, J.-C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R. & Telerman, a (2008) «TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.», Cell death and differentiation, 15(8), pp. 1211-1220. doi: 10.1038/cdd.2008.18.

Suzuki, S. & Suzuki, H. (2014) «Recent advances in forest tree biotechnology», Plant Biotechnology, 31(1), pp. 1-9. doi: 10.5511/plantbiotechnology.13.1203b.

Tahir, M., Law, D. a & Stasolla, C. (2006) «Molecular characterization of PgAGO, a novel conifer gene of the Argonaute family expressed in apical cells and required for somatic embryo development in spruce.», Tree physiology, 26(10), pp. 1257-1270. doi: 10.1093/treephys/26.10.1257.

Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. (2008) «The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins», Plant and Cell Physiology, 49(4), pp. 493-500. doi: 10.1093/pcp/pcn043.

Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P. & Zamore, P. D. (2003) «A biochemical framework for RNA silencing in plants.», *Genes & development*, 17(1), pp. 49-63. doi: 10.1101/gad.1048103.

Tani, T., Shimada, H., Kato, Y. & Tsunoda, Y. (2007) «Bovine oocytes with the potential to reprogram somatic cell nuclei have a unique 23-kDa protein, phosphorylated transcriptionally controlled tumor protein (TCTP).», *Cloning and stem cells*, 9(2), pp. 267-80. doi: 10.1089/clo.2006.0072.

Tao, J.-J., Cao, Y.-R., Chen, H., Wei, W., Li, Q.-T., Ma, B., Zhang, W.-K., Chen, S.-Y. & Zhang, J.-S. (2015) «Tobacco TCTP interacts with ethylene receptor NTHK1 and enhances plant growth through promotion of cell proliferation», *Plant Physiology*, 169(November), p. pp.00355.2015. doi: 10.1104/pp.15.00355.

Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T. & Kishi, K. (1998) «Macrophage Colony-Stimulating factor Stimulates Synthesis and secretion of a mouse Homolog of a Human IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor by Macrophages In Vitro and In Vivo».

Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, a M., Price, C., Waltho, J. P. & Craven, C. J. (2001) «Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones.», *Nature structural biology*, 8(8), pp. 701-704. doi: 10.1038/90415.

Thébault, S., Agez, M., Chi, X., Stojko, J., Cura, V., Telerman, S. B., Maillet, L., Gautier, F., Billas-Massobrio, I., Birck, C., Troffer-Charlier, N., Karafin, T., Honoré, J., Senff-Ribeiro, A., Montessuit, S., Johnson, C. M., Juin, P., Cianfêrani, S., Martinou, J.-C., Andrews, D. W., Amson, R., Telerman, A. & Cavarelli, J. (2016) «TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL.», *Scientific reports. Nature Publishing Group*, 6, p. 19725. doi: 10.1038/srep19725.

Thibaud-Nissen, F., Shealy, R. T., Khanna, A. & Vodkin, L. O. (2003) «Clustering of Microarray Data Reveals Transcript Patterns Associated with Somatic Embryogenesis in Soybean», *PLANT PHYSIOLOGY*, 132(1), pp. 118-136. doi: 10.1104/pp.103.019968.

Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H. & Thiele, B. (1998) «Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23», *European Journal of Biochemistry*, 257(1), pp. 62-68. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2570062.x.

Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A. & Thiele, B. J. (2000) «Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled turnout protein (TCTP)», *European Journal of Biochemistry*, 267(17), pp. 5473-5481. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01609.x.

- Thomas, G., Thomas, G. & Luther, H. (1981) «Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), pp. 5712-5716. doi: 10.1073/pnas.78.9.5712.
- Tolia, N. H. & Joshua-Tor, L. (2007) «Slicer and the argonautes.», *Nature chemical biology*. Nature Publishing Group, 3(1), pp. 36-43. doi: 10.1038/nchembio848.
- Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D. S., Bennett, R., Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Theurkauf, W. E. & Zamore, P. D. (2004) «RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*.», *Cell*, 116(6), pp. 831-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035985>.
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P. D. (2007) «Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs.», *Cell*, 130(2), pp. 299-308. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.057.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P. D. (2004) «A protein sensor for siRNA asymmetry.», *Science (New York, N.Y.)*, 306(5700), pp. 1377-80. doi: 10.1126/science.1102755.
- Toribio, M., Fernández, C., Celestino, C., Martínez, M. T., San-José, M. C. & Vieitez, A. M. (2004) «Somatic Embryogenesis in Mature *Quercus Robur* Trees», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Kluwer Academic Publishers, 76(3), pp. 283-287. doi: 10.1023/B:TICU.0000009245.92828.26.
- Toscano-morales, R., Xoconostle-cázares, B., Cabrera-ponce, J. L., Hinojosa-moya, Jesús Luis, Jorge Galván-gordillo, V. & Guevara-gonzález, R. G. (2015) «AtTCTP2 , an *Arabidopsis thaliana* homolog of Translationally Controlled Tumor Protein , enhances in vitro plant regeneration Article type: Received on: Accepted on: Frontiers website link: Citation: Running head: *Arabidopsis* AtTCTP2 induces whole-pl», *Frontiers in Plant Science*, (June). doi: 10.3389/fpls.2015.00468.
- Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A. C. & Ruiz-Medrano, R. (2014) «Long distance movement of an *Arabidopsis* Translationally Controlled Tumor Protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco.», *Frontiers in plant science*, 5(December), p. 705. doi: 10.3389/fpls.2014.00705.
- Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A. C. & Ruiz-Medrano, R. (2015) «AtTCTP2 mRNA and protein movement correlates with formation of adventitious roots in tobacco», *Plant Signaling & Behavior*, 2324(November), pp. 00-00. doi: 10.1080/15592324.2015.1071003.

Trisciuglio, D., De Luca, T., Desideri, M., Passeri, D., Gabellini, C., Scarpino, S., Liang, C., Orlandi, A. & Del Bufalo, D. (2013) «Removal of the BH4 domain from Bcl-2 protein triggers an autophagic process that impairs tumor growth.», *Neoplasia* (New York, N.Y.), 15(3), pp. 315-27. Disponibile en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479509>.

Tsarova, K., Yarmola, E. G. & Bubb, M. R. (2010) «Identification of a cofilin-like actin-binding site on translationally controlled tumor protein (TCTP)», *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(23), pp. 4756-4760. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.054.

Tsuwamoto, R., Yokoi, S. & Takahata, Y. (2010) «*Arabidopsis* EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase», *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands, 73(4-5), pp. 481-492. doi: 10.1007/s11103-010-9634-3.

Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R. *et al.*, (2006) «The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)», *Science*, 313(5793).

Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. & Telerman, A. (2002) «Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 14976-14981. doi: 10.1073/pnas.222470799.

Ueki, S. & Citovsky, V. (2002) «The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein.», *Nature cell biology*, 4(7), pp. 478-86. doi: 10.1038/ncb806.

Ueki, S. & Citovsky, V. (2005) «Identification of an interactor of cadmium ion-induced glycine-rich protein involved in regulation of callose levels in plant vasculature.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), pp. 12089-94. doi: 10.1073/pnas.0505927102.

- Umezawa, T., Suzuki, S. & Shibata, D. (2008) «Tree Biotechnology of Tropical Acacia», Plant Biotechnology. Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology, 25(3), pp. 309-313. doi: 10.5511/plantbiotechnology.25.309.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012) «Primer3-new capabilities and interfaces», Nucleic Acids Research, 40(15), pp. 1-12. doi: 10.1093/nar/gks596.
- Urbez, C., Cercós, M., Perez-Amador, M. A. & Carbonell, J. (2006) «Expression of PsGRP1, a novel glycine rich protein gene of *Pisum sativum*, is induced in developing fruit and seed and by ABA in pistil and root», Planta, 223(6), pp. 1292-1302. doi: 10.1007/s00425-005-0178-8.
- Valladares, S., Rico, S., Vieitez, A. M., Covelo, P. & Sánchez, C. (2013) «Expression of the QrCPE gene is associated with the induction and development of oak somatic embryos», Tree Genetics and Genomes, 9(6), pp. 1383-1393. doi: 10.1007/s11295-013-0634-8.
- Valladares, S., Sánchez, C., Martínez, M. T., Ballester, A. & Vieitez, A. M. (2006) «Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis.», Plant cell reports, 25(9), pp. 879-886. doi: 10.1007/s00299-005-0108-z.
- Vaucheret, H. (2008) «Plant ARGONAUTES», Trends in Plant Science, 13(7), pp. 350-358. doi: 10.1016/j.tplants.2008.04.007.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P. & Bartel, D. P. (2004) «The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development.», Genes & development, 18(10), pp. 1187-97. doi: 10.1101/gad.1201404.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J.-L., Bartel, D. P. & Crété, P. (2004) «Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs.», Molecular cell, 16(1), pp. 69-79. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.028.
- Veena, Jiang, H., Doerge, R. W. & Gelvin, S. B. (2003) «Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression», Plant Journal, 35(2), pp. 219-236. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01796.x.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli,

M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L. M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J. T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V. T., King, S. T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A. *et al.*, (2010) «The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.)», *Nature Genetics. Nature Research*, 42(10), pp. 833-839. doi: 10.1038/ng.654.

Venkatachalam, P., Srivastava, A. K., Raghothama, K. G. & Sahi, S. V. (2009) «Genes Induced in Response to Mercury-Ion-Exposure in Heavy Metal Hyperaccumulator *Sesbania drummondii*», *Environmental Science and Technology*, 43(3), pp. 843-850. doi: 10.1021/es801304n.

Venugopal, T. (2005) «Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish.», *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 142(1), pp. 8-17. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.04.011.

Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M. T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L. a, Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D. M., Xuan, P., Del Fabbro, C., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D. S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arús, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., Rokhsar, D. S., Fabbro, C. Del, Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D. S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E. *et al.*, (2013) «The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution», *Nature genetics. Nature Research*, 45(5), pp. 487-94. doi: 10.1038/ng.2586.

Vidal, N., Mallón, R., Valladares, S., Meijomín, A. M. & Vieitez, A. M. (2010) «Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of juvenile and mature *Quercus robur*», *Plant Cell Reports. Springer-Verlag*, 29(12), pp. 1411-1422. doi: 10.1007/s00299-010-0931-8.

Vieitez, A.M., Vieitez, M.L., Vieitez, E. 1986. "Chestnut (*Castanea* spp)". En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 1. Bajaj, Y.P.S. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 393-414.

Vieitez, A. M., Corredoira, E., Martínez, M. T., San-José, M. C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N. & Ballester, A. (2012) «Application of biotechnological tools to *Quercus*

improvement», *European Journal of Forest Research*. Springer-Verlag, 131(3), pp. 519-539. doi: 10.1007/s10342-011-0526-0.

Vieitez, F. J. (1995) «Somatic embryogenesis in chestnut», en Jain, S. M., Gupta, P., y Newton, R. (eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer Netherlands (Forestry Sciences), pp. 375-407. doi: 10.1007/978-94-011-0491-3_21.

Vieitez, F. J., San Jose, M. C., Ballester, A. & Vieitez, A. M. (1990) «Somatic Embryogenesis in Cultured Immature Zygotic Embryos in Chestnut», *Journal of Plant Physiology*, 136, pp. 253-256. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81675-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81675-5).

Vielba, J. M., Díaz-Sala, C., Ferro, E., Rico, S., Lamprecht, M., Abarca, D., Ballester, A. & Sánchez, C. (2011) «CsSCL1 is differentially regulated upon maturation in chestnut microshoots and is specifically expressed in rooting-competent cells.», *Tree physiology*, 31(10), pp. 1152-60. doi: 10.1093/treephys/tpr086.

Vielba, J. M., Valladares, S., Corredoira, E., Vieitez, A. M. & Sanchez, C. (2008) «CLONING OF CsCPE cDNA FROM CHESTNUT SOMATIC EMBRYOS: COMPARATIVE EXPRESSION ANALYSIS WITH ZYGOTIC EMBRYOS», en *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp. 93-98. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.784.13.

Villani, F., Pigliucci, M., Cherubini, M., Anagnostakis, S. L., Barbujani, G., Pigliucci, M., Cavalli-Sforza, L. L., Edwards, A. W. F., da Cunha, A. B., Burla, H., Dobzhansky, T., Farris, J. S., Heywood, J. S., Mayr, E., Nee, S., Pigliucci, M., Benedettelli, S., Villani, F., Pigliucci, M., Villani, F., Benedettelli, S., POULIK, M. D., Sokal, R. R., Jacquez, G. M., SOKAL, R. R., ODEN, N. L., SOKAL, R. R., ODEN, N. L., Villani, F., Pigliucci, M., Benedettelli, S., Cherubini, M., Villani, F., Pigliucci, M., Lauteri, M., Cherubini, M., Sun, O., White, M. J. D., Wilson, J. B., Ronghua, Y., Mark, A. F. & Agnew, A. D. Q. (1994) «Evolution of *Castanea sativa* Mill, in Turkey and Europe», *Genetical Research*. Cambridge University Press, 63(2), p. 109. doi: 10.1017/S0016672300032213.

Vincent, D., Ergül, A., Bohlman, M. C., Tattersall, E. A. R., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Woolsey, R., Quilici, D. R., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, D. A., Cushman, J. C., Cramer, G. R., Ergul, A., Bohlman, M. C., Tattersall, E. A. R., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Woolsey, R., Quilici, D. R., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, D. A., Cushman, J. C., Cramer, G. R., Ergül, A., Bohlman, M. C., Tattersall, E. A. R., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Woolsey, R., Quilici, D. R., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, D. A., Cushman, J. C. & Cramer, G. R. (2007) «Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet

Sauvignon and their responses to water deficit and salinity», *Journal of Experimental Botany*, 58(7), pp. 1873-1892. doi: 10.1093/jxb/erm012.

Voshall, A., Kim, E. J., Ma, X., Moriyama, E. N. & Cerutti, H. (2015) «Identification of AGO3-associated miRNAs and computational prediction of their targets in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*», *Genetics*, 200(1), pp. 105-121. doi: 10.1534/genetics.115.174797.

de Vries, S. C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H. D., Thomas, T. L. & van Kammen, A. (1988) «Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures», *Planta*. Springer-Verlag, 176(2), pp. 196-204. doi: 10.1007/BF00392445.

W.P., H. (1988) «Donor plant maturation and adventitious root formation.», *Advances in plant sciences series*.

Waki, T., Hiki, T., Watanabe, R., Hashimoto, T. & Nakajima, K. (2011) The *Arabidopsis* RWP-RK Protein RKD4 Triggers Gene Expression and Pattern Formation in Early Embryogenesis, *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2011.07.001.

Walker, D. J., Pitsch, J. L., Peng, M. M., Robinson, L., Peters, W., Bhisutthibhan, J., Meshnick, S. R. & Robinson, B. L. (2000) «Mechanisms of Artemisinin Resistance in the Rodent Malaria Pathogen *Plasmodium yoelii* Mechanisms of Artemisinin Resistance in the Rodent Malaria Pathogen *Plasmodium yoelii*», 44(2), pp. 344-347. doi: 10.1128/AAC.44.2.344-347.2000.Updated.

Wang, F., Shang, Y., Yang, L. & Zhu, C. (2012) «Comparative proteomic study and functional analysis of translationally controlled tumor protein in rice roots under Hg²⁺ stress», *Journal of Environmental Sciences. The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences*, 24(12), pp. 2149-2158. doi: 10.1016/S1001-0742(11)61062-0.

Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B. & Perry, S. E. (2004) «The Embryo MADS Domain Protein AGAMOUS-Like 15 Directly Regulates Expression of a Gene Encoding an Enzyme Involved in Gibberellin Metabolism», *The Plant Cell. American Society of Plant Biologists*, 16(5). doi: 10.1105/tpc.021261.

Wang, L., Shang, H., Liu, Y., Zheng, M., Wu, R., Phillips, J., Bartels, D. & Deng, X. (2009) «A role for a cell wall localized glycine-rich protein in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Boea hygrometrica*», *Plant Biology*, 11(6), pp. 837-848. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00187.x.

Wang, N., Thomson, M., Bodles, W. J. A., Crawford, R. M. M., Hunt, H. V., Featherstone, A. W., Pellicer, J. & Buggs, R. J. A. (2013) «Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and

- cross-species RAD markers», *Molecular Ecology*, 22(11), pp. 3098-3111. doi: 10.1111/mec.12131.
- Wang, X.-B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.-X., Gascioli, V., Vaucheret, H. & Ding, S.-W. (2011) «The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*.», *The Plant cell*, 23(4), pp. 1625-38. doi: 10.1105/tpc.110.082305.
- Wang, X., Tang, D. & Huang, D. (2014) «Proteomic analysis of pakchoi leaves and roots under glycine-nitrogen conditions.», *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 75(November), pp. 96-104. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.012.
- Wang, Z. Q., Li, G. Z., Gong, Q. Q., Li, G. X. & Zheng, S. J. (2015) «OsTCTP, encoding a translationally controlled tumor protein, plays an important role in mercury tolerance in rice», *BMC Plant Biology*, 15(1), p. 123. doi: 10.1186/s12870-015-0500-y.
- Wantke, F., MacGlashan, D. W., Langdon, J. M. & MacDonald, S. M. (1999) «The human recombinant histamine releasing factor: Functional evidence that it does not bind to the IgE molecule», *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(4), pp. 642-648. doi: 10.1016/S0091-6749(99)70237-X.
- Wegrzyn, J. L., Lee, J. M., Tearse, B. R. & Neale, D. B. (2008) «TreeGenes: A forest tree genome database.», *International journal of plant genomics*, 2008, p. 412875. doi: 10.1155/2008/412875.
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C. I., Rendtlew Danielsen, J. M., Yang, Y.-G. & Qi, Y. (2012) «A role for small RNAs in DNA double-strand break repair.», *Cell*, 149(1), pp. 101-12. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.002.
- West, M. & Harada, J. J. (1993) «Embryogenesis in Higher Plants: An Overview.», *The Plant cell. American Society of Plant Biologists*, 5(10), pp. 1361-1369. doi: 10.1105/tpc.5.10.1361.
- Wheeler, N. & Sederoff, R. (2009) «Role of genomics in the potential restoration of the American chestnut», *Tree Genetics & Genomes. Springer-Verlag*, 5(1), pp. 181-187. doi: 10.1007/s11295-008-0180-y.
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R. & Pikaard, C. S. (2008) «Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes.», *Cell*, 135(4), pp. 635-48. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.035.

Wierzbicki, A. T., Ream, T. S., Haag, J. R. & Pikaard, C. S. (2009) «RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin.», *Nature genetics*, 41(5), pp. 630-4. doi: 10.1038/ng.365.

Wiśniewska, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Zuzga, S., Tagashira, N., otocka, B., Malepszy, S. & Filipecki, M. (2013) «Molecular characterization of SCARECROW (CsSCR) gene expressed during somatic embryo development and in root of cucumber (*Cucumis sativus* L.)», *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5), pp. 1483-1495. doi: 10.1007/s11738-012-1189-2.

Woll, K., Dressel, A., Sakai, H., Piepho, H.-P. & Hochholdinger, F. (2006) «ZmGrp3: identification of a novel marker for root initiation in maize and development of a robust assay to quantify allele-specific contribution to gene expression in hybrids.», *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 113(7), pp. 1305-15. doi: 10.1007/s00122-006-0384-1.

Woo, H. H. & Hawes, M. C. (1997) «Cloning of genes whose expression is correlated with mitosis and localized in dividing cells in root caps of *Pisum sativum* L.», *Plant molecular biology*, 35, pp. 1045-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426627>.

Wu, J., Wang, Z., Shi, Z., Zhang, S., Ming, R., Zhu, S., Khan, M. A., Tao, S., Korban, S. S., Wang, H., Chen, N. J., Nishio, T., Xu, X., Cong, L., Qi, K., Huang, X., Wang, Y., Zhao, X., Wu, J., Deng, C., Gou, C., Zhou, W., Yin, H., Qin, G., Sha, Y., Tao, Y., Chen, H., Yang, Y., Song, Y., Zhan, D., Wang, J., Li, L., Dai, M., Gu, C., Wang, Y., Shi, D., Wang, X., Zhang, H., Zeng, L., Zheng, D., Wang, C., Chen, M., Wang, G., Xie, L., Sovero, V., Sha, S., Huang, W., Zhang, S., Zhang, M., Sun, J., Xu, L., Li, Y., Liu, X., Li, Q., Shen, J., Wang, J., Paull, R. E., Bennetzen, J. L., Wang, J. & Zhang, S. (2013) «The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)», *Genome research. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 23(2), pp. 396-408. doi: 10.1101/gr.144311.112.

Wu, J., Yang, Z., Wang, Y., Zheng, L., Ye, R., Ji, Y., Zhao, S., Ji, S., Liu, R., Xu, L., Zheng, H., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, X., Xie, L., Wu, Z., Qi, Y. & Li, Y. (2015) «Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA.», *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.05733.

Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. & Qi, Y. (2010) «DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway», *Molecular Cell*, 38(3), pp. 465-475. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.008.

Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. (2006) «TOR Signaling in Growth and Metabolism», *Cell*, 124(3), pp. 471-484. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016.

- Wysocka-Diller, J. W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J. E. & Benfey, P. N. (2000) «Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot.», *Development* (Cambridge, England), 127(3), pp. 595-603. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631180>.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A. & Carrington, J. C. (2005) «DICER-LIKE 4 functions in transacting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), pp. 12984-9. doi: 10.1073/pnas.0506426102.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E. & Carrington, J. C. (2004) «Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants.», *PLoS biology*. Public Library of Science, 2(5), p. E104. doi: 10.1371/journal.pbio.0020104.
- Xu, A., Bellamy, a R. & Taylor, J. a (1999) «Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level.», *The Biochemical journal*, 342 Pt 3, pp. 683-689. doi: 10.1042/0264-6021:3420683.
- Yan, K. S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. & Zhou, M.-M. (2003) «Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain.», *Nature*, 426(6965), pp. 468-74. doi: 10.1038/nature02129.
- Yang-Yen, H.-F. (2006) «Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller.», *Journal of biomedical science*, 13(2), pp. 201-4. doi: 10.1007/s11373-005-9064-4.
- Yang, F., Jørgensen, A. D., Li, H., Søndergaard, I., Finnie, C., Svensson, B., Jiang, D., Wollenweber, B. & Jacobsen, S. (2011) «Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain», *Proteomics*, 11(9), pp. 1684-1695. doi: 10.1002/pmic.201000654.
- Yang, L., Wu, G. & Poethig, R. S. (2012) «Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), pp. 315-20. doi: 10.1073/pnas.1114673109.
- Yang, X. & Zhang, X. (2010) «Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants», *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(March 2012), pp. 36-57. doi: 10.1080/07352680903436291.

- Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y., Xu, J., Yang, X., Zhang, X., Quiroz-Figueroa, F., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R., Loyola-Vargas, V., Domoki, M., Györgyey, J., Bíró, J., Pasternak, T., Zvara, Á., Bottka, S., Puskás, L., Dudits, D., Fehér, A., Jiménez, V., Fehér, A., Pasternak, T., Dudits, D., Marcel, A., Toonen, T., DL, S. E., Verhoeven, H., Kammen, A. van, DeVries, S., Thibaud-Nissen, F., Kurczyńska, E., Gaj, M., Ujczak, A., Mazur, E., Sung, Z., Okimoto, R., Sato, S., Toya, T., Kawahara, R., Whittier, R., Fukuda, H., Komamine, A., Zeng, F., Zhang, X., Zhu, L., Tu, L., Guo, X., Nie, Y., Su, Y., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, C., O'Neill, S., Zhang, X., Mantiri, F., Kurdyukov, S., Lohar, D., Sharopova, N., Saeed, N., Wang, X.-D., VandenBosch, K., Rose, R. *et al.*, (2010) «Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants», *Critical Reviews in Plant Sciences*. BioMed Central, 29(1), pp. 36-57. doi: 10.1080/07352680903436291.
- Yang, Y. & Karlson, D. T. (2011) «Overexpression of AtCSP4 affects late stages of embryo development in *Arabidopsis*», *Journal of Experimental Botany*, 62(6), pp. 2079-2091. doi: 10.1093/jxb/erq400.
- Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., Mirkovic, D., Nguyen, J., Wang, H. & Yang, X.-F. (2005) «An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity.», *Oncogene*, 24(December 2015), pp. 4778-4788. doi: 10.1038/sj.onc.1208666.
- Yarm, F. R. (2002) «Plk Phosphorylation Regulates the Microtubule-Stabilizing Protein TCTP», *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), pp. 6209-6221. doi: 10.1128/MCB.22.17.6209.
- Ye, R., Chen, Z., Lian, B., Rowley, M. J., Xia, N., Chai, J., Li, Y., He, X.-J. J., Wierzbicki, A. T. & Qi, Y. (2016) «A Dicer-Independent Route for Biogenesis of siRNAs that Direct DNA Methylation in *Arabidopsis*», *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 61(2), pp. 222-235. doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.015.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X. & Qi, Y. (2012) «Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* Argonaute4/siRNA complexes.», *Molecular cell*, 46(6), pp. 859-70. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.013.
- Yeh, S.-H., Lee, B.-H., Liao, S.-C., Tsai, M.-H., Tseng, Y.-H., Chang, H.-C., Yang, C.-C., Jan, H.-C., Chiu, Y.-C. & Wang, A.-Y. (2013) «Identification of genes differentially expressed during the growth of *Bambusa oldhamii*», *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 63(0), pp. 217-226. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.030>.

- Yenofsky, R., Bergmann, I. & Brawerman, G. (1982) «Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), pp. 5876-80. doi: 10.1073/pnas.79.19.5876.
- Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, a & Brawerman, G. (1983) «Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide.», *Molecular and cellular biology*, 3(7), pp. 1197-1203.
- Yeung, E. C. (1995) «Structural and Developmental Patterns in Somatic Embryogenesis», en. Springer Netherlands, pp. 205-247. doi: 10.1007/978-94-011-0485-2_6.
- Yigit, E., Batista, P. J., Bei, Y., Pang, K. M., Chen, C.-C. G., Tolia, N. H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M. J. & Mello, C. C. (2006) «Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi.», *Cell*, 127(4), pp. 747-57. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.033.
- Yokoyama, R. & Nishitani, K. (2006) «Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls.», *Journal of plant research*, 119(3), pp. 189-94. doi: 10.1007/s10265-006-0261-7.
- Yoon, E. K., Dhar, S., Lee, M.-H., Song, J. H., Lee, S. A., Kim, G., Jang, S., Choi, J. W., Choe, J.-E., Kim, J. H., Lee, M. M. & Lim, J. (2016) «Conservation and Diversification of the SHR-SCR-SCL23 Regulatory Network in the Development of the Functional Endodermis in *Arabidopsis* Shoots», *Molecular Plant*, 9(8), pp. 1197-1209. doi: 10.1016/j.molp.2016.06.007.
- Yoon, T., Jung, J., Kim, M., Lee, K. M., Choi, E. C. & Lee, K. (2000) «Identification of the Self-Interaction of Rat TCTP / IgE- Dependent Histamine-Releasing Factor Using Yeast Two-Hybrid System», *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), pp. 379-382. doi: 10.1006/abbi.2000.2108.
- Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G. W., Prusinkiewicz, P., Smith, R. S., Weijers, D., Besson, S., Dumais, J., Bougourd, S., Marrison, J., Haseloff, J., Brisson, E., Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., Bouchez, D., Smet, I. De, Beeckman, T., Smet, I. De, Vassileva, V., Rybel, B. De, Levesque, M. P., Grunewald, W., Damme, D. Van, Noorden, G. Van, Naudts, M., Isterdael, G. Van, Clercq, R. De, al., et, Dupuy, L., Mackenzie, J., Haseloff, J., Errera, L., Federici, F., Dupuy, L., Laplace, L., Heisler, M., Haseloff, J., Fernandez, R., Das, P., Mirabet, V., Moscardi, E., Traas, J., Verdeil, J. L., Malandain, G., Godin, C., Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jürgens, G., Gibson, W. *et al.*, (2014) «Genetic control of plant development by

overriding a geometric division rule.», *Developmental cell*. Elsevier, 29(1), pp. 75-87. doi: 10.1016/j.devcel.2014.02.002.

Zhai, L., Sun, W., Zhang, K., Jia, H., Liu, L., Liu, Z., Teng, F. & Zhang, Z. (2014) «Identification and characterization of Argonaute gene family and meiosis-enriched Argonaute during sporogenesis in maize», *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(11), pp. 1042-1052. doi: 10.1111/jipb.12205.

Zhang, C. X., Li, Q. & Kong, L. (2007) «Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.)», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), pp. 273-280. doi: 10.1007/s11240-007-9294-4.

Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., Li, M., Jiang, H., Wu, G., Levitt, J., Krasensky, J., Jonak, C., Valliyodan, B., Nguyen, H., Riera, M., Valon, C., Fenzi, F., Giraudat, J., Leung, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Behnam, B., Iuchi, S., Fujita, M., Fujita, Y., Takasaki, H., Osakabe, Y., Nambara, E., Marion-Poll, A., Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K., Pizzio, G., Rodriguez, L., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Yunta, C., Merilo, E., Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., Kim, S., Lu, P., Chen, N., An, R., Su, Z., Qi, B., Ren, F., Simpson, S., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tran, L., Nakashima, K., Sakuma, Y. *et al.*, (2015) «Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress», *BMC Plant Biology*. BioMed Central, 15(1), p. 17. doi: 10.1186/s12870-014-0397-x.

Zhang, D., Iyer, L. M. & Aravind, L. (2012) «Bacterial GRAS domain proteins throw new light on gibberellic acid response mechanisms.», *Bioinformatics* (Oxford, England), 28(19), pp. 2407-11. doi: 10.1093/bioinformatics/bts464.

Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z. H. & Fujise, K. (2002) «Physical and Functional Interaction between Myeloid Cell Leukemia 1 Protein (MCL1) and Fortilin», *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp. 37430-37438. doi: 10.1074/jbc.M207413200.

Zhang, J.-M., Ma, L.-F., Li, W., Zhang, J., Li, D.-D. & Li, X.-B. (2014) «Cotton TCTP1 gene encoding a translationally controlled tumor protein participates in plant response and tolerance to aphids», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, pp. 145-156. doi: 10.1007/s11240-014-0426-3.

Zhang, J., Toledo, S. M. De, Pandey, B. N., Guo, G., Pain, D. & Li, H. (2012) «Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair», 109(16). doi: 10.1073/pnas.1106300109/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1106300109.

- Zhang, L. F., Li, W. F., Han, S. Y., Yang, W. H. & Qi, L. W. (2013) «CDNA cloning, genomic organization and expression analysis during somatic embryogenesis of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from Japanese larch (*Larix leptolepis*)», *Gene*, 529(1), pp. 150-158. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.076.
- Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., Zhao, F., Huang, B., Yang, W., Tao, Y., Wang, J., Yuan, Z., Fan, G., Xing, Z., Han, C., Pan, H., Zhong, X., Shi, W., Liang, X., Du, D., Sun, F., Xu, Z., Hao, R., Lv, T., Lv, Y., Zheng, Z., Sun, M., Luo, L., Cai, M., Gao, Y., Wang, J., Yin, Y., Xu, X., Cheng, T. & Wang, J. (2012) «The genome of *Prunus mume*», *Nature Communications*. *Nature Research*, 3, p. 1318. doi: 10.1038/ncomms2290.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. & Chua, N. H. (2006) «Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense», *Genes and Development*, 20(23), pp. 3255-3268. doi: 10.1101/gad.1495506.
- Zhang, Z. & Laux, T. (2011) «The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis», *Sexual Plant Reproduction*. Springer-Verlag, 24(2), pp. 161-169. doi: 10.1007/s00497-010-0160-x.
- Zhao, C. J., Wang, A. R., Shi, Y. J., Wang, L. Q., Liu, W. De, Wang, Z. H. & Lu, G. D. (2008) «Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*», *Theoretical and Applied Genetics*, 116(4), pp. 501-516. doi: 10.1007/s00122-007-0686-y.
- Zhao, K., Zhao, H., Chen, Z., Feng, L., Ren, J., Cai, R. & Xiang, Y. (2015) «The Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in *Populus trichocarpa*: gene structure, gene expression, phylogenetic analysis and evolution.», *Journal of genetics*, 94(2), pp. 317-321.
- Zheng, Q. & Perry, S. E. (2014) «Alterations in the Transcriptome of Soybean in Response to Enhanced Somatic Embryogenesis Promoted by Orthologs of AGAMOUS-Like15 and AGAMOUS-Like18», *PLANT PHYSIOLOGY*, 164(3), pp. 1365-1377. doi: 10.1104/pp.113.234062.
- Zheng, Q., Zheng, Y. & Perry, S. E. (2013) «AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in *Arabidopsis* and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response.», *Plant physiology*. American Society of Plant Biologists, 161(4), pp. 2113-27. doi: 10.1104/pp.113.216275.
- Zhong, X., Du, J., Hale, C. J., Gallego-Bartolome, J., Feng, S., Vashisht, A. A., Chory, J., Wohlschlegel, J. A., Patel, D. J. & Jacobsen, S. E. (2014) «Molecular mechanism of action of

plant DRM de novo DNA methyltransferases.», *Cell*, 157(5), pp. 1050-60. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.056.

Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M. & Zhang, X. (2011) «*Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development.», *Cell*, 145(2), pp. 242-56. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.024.

Zilberman, D., Cao, X. & Jacobsen, S. E. (2003) «ARGONAUTE4 Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation», *Science*, 299(5607), pp. 716-719. doi: 10.1126/science.1079695.

Zimin, A., Stevens, K. A., Crepeau, M. W., Holtz-Morris, A., Koriabine, M., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Wegrzyn, J. L., de Jong, P. J., Neale, D. B., Salzberg, S. L., Yorke, J. A. & Langley, C. H. (2014) «Sequencing and assembly of the 22-gb loblolly pine genome.», *Genetics*, 196(3), pp. 875-90. doi: 10.1534/genetics.113.159715.

Zimmerman, J. L. (1993) «Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants.», *The Plant cell*, 5(10), pp. 1411-1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411.

Zuckerkindl, E. & Pauling, L. (1965) «Evolutionary divergence and convergence in proteins», *Evolving Genes and Proteins*, pp. 97-166. doi: 10.1209/epl/i1998-00224-x.

Zuo, J., Niu, Q.-W., Frugis, G. & Chua, N.-H. (2002) «The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*.», *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 30(3), pp. 349-59. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000682>.

